

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 39/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/12123 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 2000 (09.03.00)															
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06315 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. August 1999 (27.08.99) (30) Prioritätsdaten: <table border="0"> <tr> <td>198 39 254.0</td> <td>28. August 1998 (28.08.98)</td> <td>DE</td> </tr> <tr> <td>198 39 255.9</td> <td>28. August 1998 (28.08.98)</td> <td>DE</td> </tr> <tr> <td>198 39 256.7</td> <td>28. August 1998 (28.08.98)</td> <td>DE</td> </tr> <tr> <td>199 07 080.6</td> <td>19. Februar 1999 (19.02.99)</td> <td>DE</td> </tr> <tr> <td>199 24 327.1</td> <td>27. Mai 1999 (27.05.99)</td> <td>DE</td> </tr> </table> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Gässelweg 15, D-69469 Weinheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STÄHLER, Cord, F. [DE/DE]; Siegfriedstrasse 9, D-69469 Weinheim (DE). STÄHLER, Peer, F. [DE/DE]; Riedfeldstrasse 3, D-68169 Mannheim (DE). MÜLLER, Manfred [DE/DE]; Reut- terstrasse 76/b, D-80689 München (DE). STÄHLER, Fritz [DE/DE]; Gässelweg 15, D-69469 Weinheim (DE). LINDNER, Hans [DE/DE]; Vierreichenweg 27, D-70569 Stuttgart (DE).		198 39 254.0	28. August 1998 (28.08.98)	DE	198 39 255.9	28. August 1998 (28.08.98)	DE	198 39 256.7	28. August 1998 (28.08.98)	DE	199 07 080.6	19. Februar 1999 (19.02.99)	DE	199 24 327.1	27. Mai 1999 (27.05.99)	DE	(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
198 39 254.0	28. August 1998 (28.08.98)	DE															
198 39 255.9	28. August 1998 (28.08.98)	DE															
198 39 256.7	28. August 1998 (28.08.98)	DE															
199 07 080.6	19. Februar 1999 (19.02.99)	DE															
199 24 327.1	27. Mai 1999 (27.05.99)	DE															
(54) Title: METHOD AND MEASURING DEVICE FOR DETERMINING A PLURALITY OF ANALYTES IN A SAMPLE (54) Bezeichnung: VERFAHREN UND MESSEINRICHTUNG ZUR BESTIMMUNG EINER VIELZAHL VON ANALYTEN IN EINER PROBE (57) Abstract The invention relates to a method for determining a plurality of analytes in a sample which comprises the following steps: (a) bringing the sample into contact with; (i) a plurality of species of microparticles, whereby each species is suited for detecting certain analytes and a certain coding which can be optically differentiated from other species, and bringing in contact with; (ii) a plurality of soluble, analyte-specific analytical reagents which support a signal-emitting group or which can bind with a signal-emitting group; (b) subsequently depositing the microparticles on a support and at least; (c) determining the analytes by optically detecting the coding and the quantity, and determining the presence and/or the absence of the signal-emitting groups on at least one species of individual microparticles on the support. The invention also relates to a measuring device for carrying out the inventive method. (57) Zusammenfassung Es wird ein Verfahren zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe angegeben, umfassend die Schritte: (a) Inkontaktbringen der Probe mit (i) einer Vielzahl von Spezies von Mikropartikeln, wobei jede Spezies zum Nachweis von bestimmten Analyten geeignet ist und eine bestimmte, von anderen Spezies optisch unterscheidbare Codierung aufweist, und (ii) einer Vielzahl von löslichen analytspezifischen Nachweisreagenzien, die eine signalgebende Gruppe tragen oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig sind; (b) anschließendes Aufbringen der Mikropartikel auf einen Träger und mindestens (c) Bestimmen der Analyten durch optisches Erfassen der Codierung und der Menge, des Vorhandenseins oder/und der Abwesenheit der signalgebenden Gruppen auf mindestens einer Spezies von individuellen Mikropartikeln auf dem Träger. Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Meßeinrichtung zur Durchführung des Verfahrens.																	

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren und Meßeinrichtung zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Meßeinrichtung zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe. Gegenstand der Erfindung sind ferner ein Kit und ein Meßsubstansträger zur Verwendung bei
10 der Durchführung des Verfahrens.

1 Anwendungsgebiet

1.1 Hintergrund

15

Für die Grundlagenforschung in den Biowissenschaften und für die medizinische Diagnostik sowie einige andere Disziplinen ist die präzise Detektion biologisch relevanter Moleküle in definiertem Untersuchungsmaterial von herausragender Bedeutung. Jeder
20 Organismus ist letztlich aus verschiedenen biologischen Makromolekülen, häufig Polymere wie Nukleinsäuren und Proteine, und davon abgeleiteten Substanzen sowie den Produkten spezieller enzymatischer Syntheseleistungen aufgebaut. Dabei liegt die genetische Information in Form einer enormen Vielfalt von
25 unterschiedlichen Nukleinsäuresequenzen vor, der DNA. Die Realisation dieser Information führt über die Herstellung von Abschriften der DNA in RNA meist zur Synthese von Proteinen, die ihrerseits häufig an biochemischen Reaktionen beteiligt sind. Sekundär werden dadurch zahlreiche organische, teils
30 niedermolekulare, Verbindungen auf- und abgebaut.

Somit ergibt sich eine enorme Vielfalt von Substanzen im Körper. Hinzu kommen darüber hinaus noch andere Moleküle, die dem Körper von außen zugeführt werden, wie etwa Pharmaka oder drugs of abuse'.

5

Für die Beschreibung des gesunden wie auch des kranken Zustandes eines Organismus ist die Kenntnis über Vorkommen, Menge und Umsatz zumindest der wichtigeren dieser Moleküle außerordentlich nützlich. Mit der Zunahme dieser Kenntnis steigen Verständnis der Zusammenhänge und Nutzen exponentiell an. In der Medizin konnte in stark zunehmendem Masse durch die in vitro-Diagnostik (IVD) ein Instrumentarium zur Bestimmung wichtiger Patientenparameter entwickelt und dem behandelnden Arzt zur Verfügung gestellt werden. Für viele Erkrankungen wäre eine Diagnose zu einem ausreichend frühen Zeitpunkt ohne dieses Instrumentarium nicht möglich (z.B. Infektionskrankheiten wie HIV, HBV o.a.). Das gleiche gilt für eine krankheitsbegleitende Kontrolle spezifischer Parameter (z.B. Blutzuckerspiegel bei Diabetes). In enger Verzahnung von Grundlagenforschung und klinischer Forschung konnten in der Biomedizin die molekularen Ursachen und (pathologischen) Zusammenhänge einiger Krankheitsbilder bis auf die Ebene der genetischen Information aufgeklärt werden. Diese Entwicklung steht allerdings noch am Anfang, und gerade für die Umsetzung in Therapiestrategien bedarf es stark intensiver Anstrengungen.

10

15

20

25

1.2 Bedarf

30

In der klinischen Diagnostik sind IVD-Verfahren ein unverzichtbares Hilfsmittel geworden. Dabei wird zunehmend versucht, die Zahl der bestimmbar Parameter zu erhöhen. Neue Technologien führen zur sog. Multiplex-Analyse, bei der versucht wird, die Analyse einer Mehrzahl oder Vielzahl von Analyten in einem Verfahren zu

integrieren. Dabei wird gleichzeitig versucht, die Vorrichtungen zu verkleinern oder zu miniaturisieren. Die meisten IVD-Verfahren erfassen nur wenige Parameter, d.h. deutlich unter 100, in einem Durchlauf. Die gleichzeitige Detektion von Nukleinsäuren, um z.B. eine genetische Prädisposition zu erkennen, und anderen Faktoren, z.B.: Auto-Antikörper im Rahmen einer Autoimmunerkrankung wie Rheuma, findet bisher nicht statt. Die Nukleinsäurediagnostik, die z.B. Infektionen mit HIV nachweisen kann, setzte bisher auf molekularbiologische Verfahren wie die Polymerase Chain Reaction (PCR) oder Sequenzierung, die entweder nur begrenzte Informationen liefern oder sehr aufwendig und damit teuer sind. Für die Erhebung großer Datenmengen in breiter Anwendung sind sie daher schon aus Kostengründen teilweise ungeeignet. Ein neuer und viel beachteter Ansatz ist die Nukleinsäureanalyse durch Hybridisierung an immobilisierte Oligonukleotide (Oligos) auf einem festen Untergrund, z.B. einer Silizium-Matrix. Bei solchen sogenannten DNA-Chips wird durch die Bindung komplementärer Stränge an die immobilisierten Oligos ein Signal generiert, wobei eine extrem dichte und miniaturisierte Anordnung der Oligos auf dem Chip, z.B. durch photolithographische Synthese, erreicht und damit die Anzahl der Messpunkte pro Versuch sehr stark erhöht wird. Die Erstellung solcher DNA-Chips ist allerdings sehr aufwendig und teuer; außerdem ist die Länge der Oligos beschränkt. Jeder zusätzliche Baustein erfordert umfangreiche Synthese- und Waschschrte. Der Einsatz solcher Bio-Chips ist zur Zeit auf die Nukleinsäureanalytik beschränkt. Die Analyse der physiologischen Zusammenhänge nur auf Basis der Gene, d.h. Nukleinsäuren, ist nicht möglich. Die sogenannte funktionelle Genomik versucht, aufbauend auf der Genanalyse z.B. mit Biochips, das Zusammenspiel vieler Gene zu entschlüsseln (funktionelle Genomik). Die Analyse der Genprodukte (meist Proteine) und ihr Zusammenwirken als ganzes erfolgt unter dem Überbegriff Proteomik. Hier gibt es allerdings im Gegensatz zur Nukleinsäure-

analytik noch kaum Ansätze für hochintegrierte Formate wie die DNA-Chips, die Arbeiten werden mit weniger integrierten und meist seriell funktionierenden Verfahren durchgeführt. Dennoch wird bereits auf dieser Basis für die Diagnose und Therapie von Krankheiten sehr wertvolles Wissen geschaffen. Für diese zukünftigen Arbeiten sind neue methodische und apparative Voraussetzungen notwendig. In der biologischen und biomedizinischen Grundlagenforschung herrscht bis heute allgemein ein hohes Maß an manuellen Arbeitsschritten vor, gerade auch in der Analyse von Genprodukten und ihrer Bedeutung im Kontext von Zelle und Organismus. Damit sind zum einen Schwankungen z.B. in der Durchführung von Experimenten und Assays verbunden, aber auch entsprechende Personalkosten pro erzeugter Information und meist ein hoher Zeitaufwand.

Insgesamt ergibt sich das folgende Bild:

Um die Versprechungen der modernen Biomedizin für die Patientenversorgung einzulösen, muß eine hochparallele Multiplex-Analyse von 10^2 bis 10^6 Parameter ermöglicht werden, idealerweise die gemeinsame Detektion sehr verschiedener Analyten wie Proteine, Hormone oder Nukleinsäuren, ohne damit unverhältnismäßig hohe Kosten zu verursachen. Eine solche Technologie ist in dieser Patentanmeldung beschrieben.

1.3 Anwendungsfelder der Erfindung

In vitro Diagnostik und klinische Diagnostik

Zusammenführen einer Vielzahl von Parametern zur akuten Diagnose und zur Routineuntersuchung (präventive Medizin); daraus wird sich wertvolles, statistisch auszuwertendes Wissen zur (extrem) frühen Diagnostik verschiedenster Krankheitsbilder ableiten; die erzeugte

Datenmenge ist erst durch die Entwicklungen in der Informationstechnologie auswertbar geworden.

DNA und RNA Diagnostik

5

- Infektionskrankheiten (HIV, HBV etc.),
- Tumorfrüherkennung,
- Tumorklassifizierung (Typ und Status),
- Genkrankheiten,
- 10 - Onkologie

Biologische Grundlagenforschung, insbesondere Genomik und Proteomik

15

Erfassung von sehr vielen Messpunkten im untersuchten System, z.B. alle exprimierten Gene oder alle in ein Kulturmedium abgegebenen Proteine und Wachstumsfaktoren; daraus wird sich ein enormer Erkenntnisgewinn in der biologischen Grundlagenforschung (Entwicklungsbiologie, Stammzellkultur, Tissue engineering, Transplantationsmedizin, Regeneration) ableiten, der auch zu

20 wichtigen Durchbrüchen in der Biomedizin und zu entsprechenden Anwendungen führen wird.

Forensik

25

Sowohl genetische als auch immunologischen Parameter werden für die Spurenanalyse verwendet.

30

Lebensmittelanalytik

5 Durch diese Erfindung sollte das rasche, kosteneffektive Analysieren von Lebensmitteln z.B. auf das Vorhandensein bestimmter Gene oder Proteine hin möglich werden.

Screening von medizinischen Produkten

10 Die Herstellung z.B. von Blutpräparaten ist immer noch mit einem hohen Aufwand für die Sicherheitsvorkehrungen zur Reinheit verbunden. Ein zeit- und kosteneffektives Screening solcher Proben wird mit dieser Erfindung möglich werden.

2. Stand der Technik

15

Bei BioChips handelt es sich um miniaturisierte hybride Funktionselemente mit biologischen und technischen Komponenten, z.B. an der Oberfläche immobilisierte Biomaterialien, die als spezifische Interaktionspartner dienen können (z.B. Antikörper, DNA-Oligonukleotide) und eine Silizium-Matrix. Meist sind diese Funktionselemente in Reihen und Spalten angeordnet, man spricht dann von BioChip Arrays. Da tausende von biochemischen Funktionselementen auf dem BioChip angeordnet sein können, müssen diese mit mikrotechnischen Methoden hergestellt werden.

25

Bisher bekannte BioChips lassen sich nach folgenden Kriterien klassifizieren:

Nachweisprinzip:

30

- Chromatographische Verfahren

- Interaktion von Analyten mit fester Phase, meist immobilisierter Interaktionspartner (z.B. Hybridisierung von Nukleinsäuren an DNA-Oligonukleotide).
- Detektionsverfahren (optisch, elektrisch).

5

Markerbasiert (z.B. Absorption, Fluoreszenz oder Lumineszenz) oder markerfreie Nachweisverfahren (Lichterzeugung zum Reaktionsnachweis).

10

- Zuordnung des Analyten zu seinem Träger [Festphase] (ARRAY mit mehr als einem immobilisierten Interaktionspartner pro Träger oder SINGLE mit nur einem immobilisierten Interaktionspartner pro Träger).

15

Herstellungsverfahren (z.B. Oligonukleotide direkt auf dem BioChip lichtaktiviert synthetisieren, fertig synthetisierte Oligonukleotide spotten, Beads oder Tubes beschichten).

20

Trägerarten (Glas-Chips, Kunststoff-Chips, Mikrotiterplatten, Tubes oder Beads).

- Präsentation zur Detektion (seriell, parallel).

25

Optische Detektion (seriell im Scanner oder parallel mit einer CCD-Kamera).

30

Im Umfeld von Biochips ist die Bereitstellung von Polymersonden in Form von Oligonukleotiden auf der Oberfläche eines planaren Trägers mittels photolithographischer Techniken z.B. aus US-Patent 5,744,305 bekannt. Hierbei kann ein besonders hoher Grad der Miniaturisierung mit tausenden von Sonden pro Quadratzentimeter erreicht werden, wobei die Sonden in einem Array angeordnet sind.

Mehrfach sind Verfahren beschrieben, bei denen unterschiedliche Rezeptoren bzw. Sonden, die in einem Fluid vorliegen, in Form kleiner bis sehr kleiner Tropfen auf feste Träger aufgebracht und dort ggf. immobilisiert werden. Technische Lösungen für diese Art des Herstellens eines Trägers stammen zum Teil aus der Tintenstahl-Drucktechnik. Verfahren dieser Art sind durch die Handhabung der fertigen Sonden im Fluid, die in einzelnen Vorratsgefäßen aufbewahrt werden und in der Zahl der unterschiedlichen Rezeptoren auf einem Träger limitiert. Derzeit bekannte Anwendungen erreichen bei sehr aufwendigen Ausführungsformen maximal 10.000 unterschiedliche Sonden pro Träger.

Bei Verfahren mit Mikropartikeln ist die Verwendung solcher Partikel im Zusammenhang mit einer Zellzählmaschine (Fluorescent activated cell sorting FACS) beschrieben worden. Außerdem können sehr kleine Partikel in einem Verfahren, das sich auf Fluoreszenz-Markierung der Mikropartikel stützt, durch Verwendung angeätzter Glasfaser-Mikrowells im Rücklicht untersucht werden, worauf ein Analytbestimmungsverfahren aufgebaut wird.

Das US-Patent 4,767,205 beschreibt ein Verfahren zur codierten Identifizierung eines ausgewählten Gegenstands, wobei gleichförmige Mikropartikel mit einer Größe von 2 bis 20 μm bezüglich einer bestimmten Kombination von Größe, Form und Farbe codiert werden, und in den zu identifizierenden Gegenstand eingeführt werden. Das Patent enthält keinerlei Hinweis auf ein Verfahren zur Bestimmung von Analyten.

DE OS 36 288 beschreibt ein immunologisches Testverfahren, bei dem ein Reaktionsgefäß verwendet wird, an dessen Oberfläche mehrere Analyt-spezifische Antikörper immobilisiert sind. Nach Immobilisierung des in der Probe vorhandenen Analyten werden

Markierungspartikel, die ebenfalls analytspezifische Antikörper tragen, zugegeben, um die immobilisierten analyten auf diese Weise zu bestimmen. Ein Hinweis auf die Verwundung von Mikropartikeln als partikuläre Festphase findet sich in diesem Dokument nicht.

5

WO 98/00292 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis eines Antigens in einer Probe, wobei eine gefärbte Festphase beispielsweise eine Mikrotiterplatte verwendet wird. Es findet sich keinerlei Hinweis auf partikuläre Festphasen.

10

Das US-Patent 4,494,830 beschreibt ein Verfahren zum immunologischen Nachweis von Analyten in biologischen Flüssigkeiten unter Verwendung von unterschiedlich gefärbten Teststäben. Es findet sich keinerlei Hinweis auf die Verwendung von Mikropartikeln.

15

3. Gegenstand der Erfindung und damit gelöste Aufgabe

Die Erfindung stellt eine wichtige Alternative zu anderen parallelen Verfahren und Multiplex-Formaten dar, wie sie z.B. durch Biochips oder "coated tubes" repräsentiert werden.

20

Gegenstand der Erfindung gemäß Anspruch 1 ist ein Verfahren zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe umfassend die Schritte:

25

- (a) Inkontaktbringen der Probe mit
 - (i) einer Vielzahl von Spezies von Mikropartikeln, wobei jede Spezies zum Nachweis von bestimmten Analyten geeignet ist und eine bestimmte, von anderen Spezies optisch unterscheidbare Codierung aufweist, und

30

- (ii) einer Vielzahl von löslichen analytspezifischen Nachweisreagenzien, die eine signalgebende Gruppe tragen oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig sind,
- (b) anschließendes Aufbringen der Mikropartikel auf einen Träger und mindestens
- (c) Bestimmen der Analyten durch optisches Erfassen der Codierung und der Menge, des Vorhandenseins oder/und der Abwesenheit der signalgebenden Gruppen auf mindestens einer Spezies von individuellen Mikropartikeln auf dem Träger.

10

Bevorzugte Weiterbildungen des Verfahrens sind in den Ansprüchen 2 - 27 angegeben.

15

Das Verfahren nach der Erfindung ist insbesondere verwendbar für die Diagnostik klinischer Parameter, z.B. für die Nukleinsäure-Diagnostik, für die biologische Grundlagenforschung, für die Forensik, für die Lebensmittelanalytik und für das Screening von medizinischen Produkten.

20

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Kit gemäß Anspruch 29, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 27. Das Kit umfaßt

25

- (a) eine Vielzahl von Spezies von Mikropartikeln in freier Form, wobei jede Spezies zum Nachweis von bestimmten Analyten geeignet ist und eine bestimmte, von anderen Spezies optisch unterscheidbare Codierung aufweist,
- (b) eine Vielzahl von löslichen analytspezifischen Nachweisreagenzien und
- (c) einen Träger.

30

Gegenstand ist ferner eine Meßeinrichtung nach Anspruch 30 zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe insbesondere

nach dem Verfahren gemäß der Erfindung. Die Meßeinrichtung umfaßt einen elektronischen Bilderfassungssensor zur unvergrößert-bildweisen Detektion des optischen Verhaltens eines Ensembles von mit der Probe in Kontakt gebrachten, auf einen Träger aufgebrachten
5 Mikropartikeln, Mittel zur Anregung der Signalabgabe signalgebender Gruppen an Mikropartikeln in dem Ensemble von Mikropartikeln auf dem Träger, eine Bilddaten des elektronischen Bilderfassungssensors auswertende Datenverarbeitungseinrichtung zur Bereitstellung von Informationen über das Vorhandensein bestimmter Analyten in der
10 Probe auf der Basis des detektierten optischen Verhaltens des Ensembles von Mikropartikeln.

Bei dem elektronischen Bilderfassungssensor handelt es sich vorzugsweise um einen farbtüchtigen CCD-Bildaufnehmer. Der
15 Bildaufnehmer kann unmittelbar mit dem Träger in Verbindung gebracht werden, so daß umständliche optische Bildübertragungslinsen, Lichtleiter und optische Vergrößerungselemente entfallen können.

20 Bevorzugte Weiterbildungen der in Anspruch 30 angegebenen Meßeinrichtung nach der Erfindung sind in den Ansprüchen 31 - 38 angegeben.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Träger für die Durchführung
25 des Verfahrens nach der Erfindung, wobei der Träger einen Hohlraum, insbesondere einem flächig ausgedehnten Kapillarspalt zur Aufnahme des Ensembles von Mikropartikeln zwischen zwei mit ihren Flachseiten einander gegenüberliegenden Platten aufweist, von denen wenigstens eine transparent ist.

30 Der Abstand zwischen den beiden Platten ist so gewählt, daß in den Hohlraum jeweils nur eine Schicht von nebeneinander liegenden

Mikropartikeln paßt. Gegebenenfalls kann der Abstand zwischen den Platten wahlweise einstellbar sein.

5 Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Träger zur Durchführung des Verfahrens nach der Erfindung, wobei der Träger eine Vielzahl insbesondere parallel zueinander verlaufender Kapillarkanäle aufweist und zumindest im Bereich der Kapillarkanäle optisch transparent ist. Der letztgenannte Träger ermöglicht auf einfache Weise die bewegliche Präsentation der Mikropartikel während der optischen
10 Detektion.

Mit dem hier als "Fraktal SMART Chip - FSC" bezeichneten Träger können Tausende unterschiedlicher Assays (Messungen) in einem Meßvorgang durchgeführt werden. Das Prinzip des fraktalen BioChips
15 beruht auf einer doppelten Codierung der als Immobilisierungspartner dienenden Festphase aus Mikropartikeln (Beads). An diese codierten Beads (z.B. farbcodierte Glas- oder Polymerbeads) werden Fängermoleküle (z.B. Oligonukleotide) immobilisiert, wodurch die "intelligenten, individuellen" SMART Beads entstehen. Durch die
20 Kodierung der SMART Beads sind die Fängermoleküle auf der Oberfläche der SMART Beads jederzeit lokalisierbar und identifizierbar. Zum anderen kann z.B. auch der in der Probe gesuchte Zielanalyt (z.B. ein DNA-Analyt) kodiert werden (z.B. mit Fluoreszenzlabel). Im Analysesystem lagern sich dann die jeweils
25 passenden Zielanalytmoleküle an die Fängermoleküle auf der SMART Beadoberfläche an. Diese Anlagerung geschieht vorzugsweise in einem dreidimensionalen Gefäß unter entsprechend günstigen strömungstechnischen Mischungsbedingungen.

30 Zur Detektion und Auswertung der jeweiligen Molekülanlagerungen werden die SMART Beads auf einen Träger gebracht, der vorzugsweise eine planare Anordnung ausbildet. Die SMART Beads

müssen dabei nicht in ein festes Gitter oder geometrisches Raster eingebracht werden. Auf Grund der planaren Ausrichtung der SMART Beads und der optischen, doppelten Kodierung kann die Detektion aller SMART Beads parallel mit Hilfe von CCD-Techniken erfolgen und
5 zwar sowohl im ruhenden wie auch im bewegten Zustand der SMART Beads.

Bei der Detektion kann auf optisch abbildende Linsensysteme verzichtet werden, wenn parallel gerichtetes Licht eingesetzt wird
10 und die Größe der SMARTS so gewählt wird, daß sie eine ausreichende Anzahl Pixelelemente des Farb-CCD-Chips überdecken. Durch diese direkte Nutzung (keine Optik) hochparalleler CCD-Matrix Chips mit einer großen Anzahl (derzeit 8 Mio. Farbpixel pro 1 cm²) an Pixeln (optischen Meßpunkten bzw. Sensoren) ist es möglich eine
15 Vielzahl von SMART Beads anhand ihrer spezifischen Farbkodierung (spektrale Identität) zu detektieren. Aufwendige Bewegungseinrichtungen für den Träger (Chip) oder die Detektionseinheit, wie sie in Scannern notwendig sind, entfallen völlig. Die vorgegebenen Abmessungen der CCD-Chips (mehrere cm²) ermöglichen die
20 Verwendung einer sehr großen Zahl an SMART Beads (mehrere 100.000) mit einer moderaten Partikelgröße (mehrere 10 µm), welche auch eine spektrale Identifikation nach dem Absorptionsprinzip zuläßt. Dadurch können wesentlich mehr Identitäten (Farben) fehlerfrei identifiziert werden, als dies bei einer
25 Fluoreszenzfarbgebung (trotzdem auch anwendbar) möglich wäre. Derzeit können CCD-Chips ca. 16 Mio. Farben erkennen. Die maximale Anzahl unterschiedlicher spektraler Identitäten, welche noch fehlerfrei detektiert werden können, ist durch die notwendige spektrale Abstufung für die optische Messung sowie die Möglichkeit
30 der reproduzierbaren Farbgebung der SMART Beads im Produktionsprozess gegeben.

Die Identifikation umfaßt sowohl die Bestimmung der SMART Bead Klasse (Farbe), als auch der exakten Lage. Dies wird durch die Vielzahl an CCD-Pixeln, welche pro SMART Bead zur Detektion zur Verfügung stehen, ermöglicht. Diese Vielzahl an Meßwerten bildet die Basis welche ein umfangreiches, mathematisches Multiplexen, bei der Identifikation des einzelnen SMART Beads, im zweidimensionalen Array erlaubt. Das Bearbeiten der anfallenden Datenmengen ist, durch die Entwicklung der Leistungsfähigkeit bei gleichzeitigem Preisverfall von modernen Rechnersystemen, problemlos möglich.

10

Die Detektion der Nachweisreaktion kann sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen machen:

15

* Welche Fängermoleküle bzw. Polymersonden (Auswertung über Beadfarbe oder ggf. charakteristische Formkontur) haben Anlagerungspartner gefunden (Auswertung der fluoreszenzmarkierten Labels an den lokalisierten Beads).

20

* Wieviele Fängermoleküle einer Klasse haben einen Hybridisierungspartner gefunden.

25

Die - relativ zu anderen Bead-Verfahren - großen SMART Beads erlauben sowohl bei der Produktion (Erzeugung und biochemische Beschichtung) als auch im Analysesystem einschließlich Detektionseinheit eine einfache fluidische Handhabung, welche bis auf die Handhabung eines einzelnen Mikropartikels optimiert werden kann. Das Gleiche gilt auch für die Detektion. Auch hier ist besonders für Anwendungen in der DNA-Analytik eine Identifikation des einzelnen SMART Beads möglich.

30

Die Erfindung deckt somit folgende Anforderungen in der klinischen Diagnostik:

* Vielzahl der simultan bestimmbarer Parameter (erreicht durch miniaturisierte SMART Beads und hochauflösende optische Detektion).

5 * Schnelle Auswertung (erreicht durch die parallele optische Auswertung in planarer Ausbringung, welche auch noch durch eine Detektion von bewegten SMART Beads beschleunigt werden kann).

10 * Kostengünstig (erreicht durch den Verzicht auf teure, mikrosystemtechnische und optische Komponenten sowie aufwendige Synthetisierungsschritte bei der BioChip-Herstellung).

Der Wert der Erfindung liegt sehr stark in der geeigneten Kombination von Technologien.

15

4 Grundzüge des Lösungsweges

Der prinzipielle Lösungsweg in diesem System geht von der Kodierung (spezifische Identität der einzelnen Mikropartikel) über die
20 biochemische Beschichtung der Oberfläche für das Nachweisverfahren (Labeling oder coating) der SMART Beads über die Vermischung der SMART Beads mit der zu untersuchenden Probe im Analysesystem bis zur Präsentation und Detektion.

25 4.1 Fraktale feste Phase (SMART Beads) und spezifische Kodierung

Um die einzelnen SMART Beads (Mikropartikel definierter Größe und Geometrie) später eindeutig detektieren zu können, werden die Beads individuell kodiert. Das bedeutet jede SMART Bead- Klasse
30 erhält ihre eigene Identität, wodurch aus den einheitlichen Trägerkörpern identifizierbare Individuen werden, was eine Wiedererkennung der einzelnen SMART Bead- Klassen (eine Klasse

sind hier mehr als ein SMART Bead mit der gleichen Identität) in der Detektionseinheit ermöglicht. Die Mikropartikel (Beads oder Mikrosphären) werden erst durch ihre individuelle Kodierung zu eigentlichen SMART Beads.

5

Als Kodierung allgemein sind zum Beispiel die Partikelgröße, -geometrie, -gewicht und physikalische Eigenschaften wie zum Beispiel Magnetisierbarkeit o.ä. anwendbar. Diese Prinzipien weisen jedoch nur eine sehr beschränkte Anzahl an "Abstufungen" auf, so daß nur wenige verschiedene Kodierungen erzeugt werden können.

10

15

Die SMART Beads weisen vorzugsweise einen mittleren Durchmesser von mindestens 10 μm , vorzugsweise von mindestens 20 μm , besonders bevorzugt von 25 bis 200 μm und am meisten bevorzugt von 25 bis 80 μm auf. Es können optisch transparente oder optisch nichttransparente Beads eingesetzt werden, wobei Beads mit einer möglichst hohen optischen Transparenz bevorzugt sind, die eine einfache Analyse im Durchlichtverfahren ermöglichen. Bevorzugt ist weiterhin die Verwendung von SMART Beads mit einer möglichst geringen Größenvarianz, wobei mindestens 50%, besonders bevorzugt mindestens 70% und am meisten bevorzugt mindestens 90% der Beads einen Durchmesser aufweisen, der maximal bis zu 20% und vorzugsweise bis zu 10% vom mittleren Durchmesser der jeweiligen SMART Beadspezies abweicht.

20

25

Als Verfahren zur Farbcodierung der SMART Beads sind u.a. eine lichtdurchlässige Einfärbung des Materials, eine lichtdurchlässige Färbung der Oberfläche, eine lichtundurchlässige Einfärbung des Materials, eine lichtundurchlässige Färbung der Oberfläche, eine Einbettung von Fluoreszenzfarbstoffen oder ein Lumineszenzverfahren denkbar.

30

Farb- oder Elektromagnetische- Kodierungen weisen dagegen eine Vielzahl an Abstufungen auf, was die Identifikation von sehr vielen SMART Beads ermöglicht. Die Idee der vorliegenden Erfindung beruht auf der Nutzung einer Farbkodierung, also einer spektralen Identität der SMART Beads in Kombination mit der ständig wachsenden Leistungsfähigkeit von CCD-Matrix Chips zur optischen Detektion. Diese Chips können derzeit ca. 70 Millionen Farben identifizieren.

4.2 Analytbestimmung - Grundprinzip

Als allgemeines Prinzip zur Analytbestimmung soll die Bindung des Analyten an seinen spezifischen immobilisierten Interaktionspartner auf der Oberfläche eines definierten SMART Beads genutzt werden.

Dabei soll die Spezifität dieser Interaktion die selektive Bindung des Analyten nur an den dafür entsprechend bestückten, d.h. den immobilisierten Interaktionspartner tragenden, SMART Beads ermöglichen, und damit die molekulare Erkennung und anschließende Detektion des Analyten in einem heterogenen Gemisch. Alle durch ihre gleichen spektralen Eigenschaften (Farbe) als Klasse definierten SMART Beads erhalten jeweils die gleiche Bestückung mit einem immobilisierten Interaktionspartner, wobei die Bindung des Interaktionspartners vorzugsweise kovalent, aber auch nichtkovalent über adsorptive oder spezifische hochaffine Wechselwirkungen (z.B. Biotin/Avidin bzw. Streptavidin oder Hapten/Anti-Apten-Antikörper) erfolgen kann. Somit führt die Anwesenheit des Analyten im Untersuchungsmaterial zu Bindung und damit Signalerzeugung nur auf dieser spektral identifizierbaren Klasse an SMART Beads. Dieses Signal dient bei Kenntnis der jeweiligen, klassen-spezifischen Bestückung zur Identifikation des gebundenen Analyten und damit zu seiner Detektion im Untersuchungsmaterial.

Das Detektionsprinzip entspricht damit etablierten Verfahren z.B. bei der Entwicklung von ELISA Tests (enzyme linked immunosorbent assay). Die Beschichtung von Beads mit einem immobilisierten Interaktionspartner ist "Stand der Kunst" (z.B. Avidin-Beschichtung von magnetischen Beads, Dynal; Antikörper-Beschichtung im ELISA-Format, Flowmetrix von Luminex).

4.3 Vermischung der SMART Beads mit der Probe im Analysesystem

Die spezifisch farb- und analytcodierten SMART Beads werden im Analysesystem mit der zu untersuchenden Probe vermischt. Diese Vorgänge sind identisch mit denen anderer Bead-basierter Verfahren mit einer "ortsungebundenen" Festphase (zum Beispiel Flowmetrix von Luminex). Das bedeutet ein für eine spezielle Anwendung zusammengestellter Satz von SMART Beads, zum Beispiel aus 10.000 Mikropartikeln zu je 100 SMART Beads einer von 100 Klassen, wird mit der entsprechend vorbereiteten Probe in einem Gefäß zusammengebracht, inkubiert und unter geeigneten Bedingungen, z.B. geeigneten Hybridisierungsbedingungen, so lange gemischt, bis mit ausreichender Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, dass jeder SMART Bead die Möglichkeit hatte, seinen Reaktanten zu finden.

4.4 Präsentation der SMART Beads zur Detektion

Bei allen Verfahren und Techniken zur Präsentation der SMART Beads für die Detektion ist das Ziel, eine möglichst schnelle und gleichzeitig sichere und somit effiziente Detektion zu erreichen, da nur die exakt vermessenen Ereignisse zum Meßergebnis beitragen.

Die eine Möglichkeit um einen hohen Durchsatz bei der Detektion zu erreichen, ist eine möglichst schnelle Präsentation der SMART Beads

am Detektor - zum Beispiel analog zum Flow Cytometer Prinzip, wo die Partikel mit hoher Geschwindigkeit durch eine Kapillare gepreßt und am Austritt "online" im "Partikelstrahl" vermessen werden. Die erfindungsgemäß bevorzugte Möglichkeit ist eine Parallelisierung der Detektion z.B. durch eine zweidimensionale Präsentation der SMART Beads am Detektor (SMART Bead Array).

Natürlich muß der verwendete Detektor in der Lage sein die Signale ausreichend schnell und parallel zu erfassen. Hierzu sollen vorzugsweise CCD-Chips direkt, das heißt ohne Verwendung einer Optik eingesetzt werden. Dadurch sind die Abmessungen für die Fläche, auf welcher die SMART Beads zur Detektion bereitgestellt werden sollen, vorgegeben. So haben derzeit hochauflösende Standardchips (keine Sonderanfertigungen) Außenmasse von ca. 25 x 37 mm. Will man auf dieser Fläche zum Beispiel ca. 200.000 SMART Beads anordnen, so könnte jeder SMART Bead einen Durchmesser von 60 μ m haben und jeder SMART Bead würde trotzdem noch etwa 40 Farbpixel überdecken, was eine zuverlässige Detektion erst ermöglicht. Bei dichtester Packung durch reihenweises Versetzen, wären sogar noch mehr SMART Beads unterzubringen bzw. die SMART Beads könnten noch größer sein. Natürlich ist eine Miniaturisierung und damit weitere Parallelisierung denkbar. Als Verfahren zur planaren Ausbringung der SMART Beads auf einem Träger sind folgende Techniken möglich: zweidimensionaler kapillarer Spalt, parallele Kapillaren oder Röhren, Ausstreichen, Stempeln (analog Blutausstrich) oder Rollen oder Aufspotten.

4.5 Anregungslichtquelle

Um die SMART Beads in ihrer planaren Ausbringung erkennen zu können, ist eine Anregungslichtquelle notwendig, welche den Anforderungen des verwendeten Farbcodierungsverfahrens ebenso

genügt, wie dem gewählten Nachweisverfahren für eine erfolgte Reaktion auf der Oberfläche der SMART Beads. Ggf. sind für die beiden Schritte auch zwei getrennte Lichtquellen vorzusehen, so zum Beispiel, wenn die Identität der SMART Beads durch eine
5 Absorptionsmessung und der Reaktionsnachweis durch ein Fluoreszenzsignal detektiert werden soll. Mögliche Lichtarten sind paralleles, flächiges Licht (kontinuierlich oder als Blitz) oder lokale, örtliche Anregung zum Beispiel durch Lichtstriche oder Lichtpunkte.

10 Diese Lichtarten können je nach Anforderungen monochromatisch (z.B. Laserlicht für Fluoreszenzanregung) oder heterogen (z.B. Weißlicht für Absorptionsmessung) sein.

4.6 Identifikation der SMART Beads

15

Die optische Erkennung der spektralen Identität eines einzelnen SMART Beads im SMART Bead Array liefert zwei Informationen:

(1) Welcher SMART Bead Klasse (z.B. SMART Beads mit gleicher
20 Farbe) gehört ein bestimmtes SMART Bead an, woraus der auf seiner Oberfläche gebundene Analyt ermittelt werden kann (Identität: "Wer bin ich und um welchen auf meiner Oberfläche gebundenen Analyten handelt es sich folglich").

25 (2) Wo genau im planaren SMART Bead Array befindet sich der jeweilige SMART Bead (Lage: "Wo bin ich").

Genutzt werden zur Detektion von SMART Beads vorzugsweise moderne, hochauflösende CCD-Kamera Chips. Diese ermöglichen
30 sowohl eine sehr schnelle, als auch eine hoch parallele Detektion der Lichtsignale.

Die zweite Information der Lageerkennung ist bei den Präsentationsverfahren ohne genau vorgegebene Lage (kapillarer Spalt, Ausstrich etc.) notwendig, um das anschließende Signal des Nachweisverfahrens exakt einem SMART Bead zuordnen zu können.

5 Bei den Verfahren mit einer vorgegebenen Lage (Spotten etc.) kann die Information für die Qualitätssicherung verwendet werden.

4.7 CCD-Detektion der spezifischen Nachweisreaktion (Analyt-Bindung)

10 Wie in 6.2.3 im einzelnen beschrieben soll die Bindung eines Analyten direkt oder indirekt zu einem nachweisbaren Signal, vorzugsweise einem Lichtsignal führen. Dies kann z.B. durch ein Anregungslicht (Fluoreszenz) oder durch Photonenemission (Lumineszenz) erfolgen. Die Schritte Detektion des Analyt-Signals

15 und Erkennung der Bead-Kodierung können in beliebiger Reihenfolge erfolgen.

Das Lichtsignal wird auf dem CCD Chip detektiert, und zwar sowohl nach Wellenlänge (Farbe) als auch nach Intensität differenziert. Das

20 aufgenommene Spektrum kann qualitativ oder quantitativ ausgewertet werden. Zudem läßt die Unterscheidung von Wellenlängen und Intensitäten auch eine Unterscheidung von Signalquellen zu.

25 5. Entwickelte Verbesserungen und damit geschaffene Vorteile gegenüber vorhandenen Systemen

Der erfindungsgemäße fraktale Chip (FSC) verschiebt die Information über die Ausstattung eines Messpunktes (z.B. eines DNA Oligos bestimmter Sequenz) von der lokalisierten Synthese oder

30 Beschichtung (z.B. Photolithographie, Aufspotten) zur Kodierung der

fraktalen Komponenten. Damit entsteht eine extrem flexible Anordnung mit einem enormen Potential für die Multiplexanalyse.

5 Darüber hinaus gelingt in diesem Format durch Trennung von Synthese der eigentlichen Sensoren (d.h. der SMART Beads) und der Inkubation mit dem Untersuchungsmaterial die Verbindung sehr unterschiedlicher Bereiche biochemischer Diagnostik. Konkret soll die gleichzeitige Analyse von DNA, Proteinen und anderen interessierenden Parametern ermöglicht werden.

10

Durch immer neue Kombinationen bewährter SMART Klassen für einen Untersuchungsansatz können die im Batch-Verfahren hergestellten SMART Beads für eine Vielzahl von diagnostischen und analytischen Fragestellungen bereitgestellt werden. Daraus ergeben sich gerade für die Produktion große Vorteile, was sich in den Kosten niederschlägt.

15

In diesem Ansatz wird u.a. durch moderate Größe der SMART Beads, durch die direkte Detektion und durch Nutzung der hochentwickelten CCD Technologie die Realisation von 10^3 bis 10^6 unterscheidbaren SMART Bead Klassen in einem Messgang angestrebt. Dies bedeutet eine wesentliche Verbesserung des Standes der Technik, da z.B. bei fluoreszenzgestützter Kodierung von Beads bereits ab 64 unterscheidbaren Sorten große Probleme auftreten. Damit wird das erste Multiplexverfahren bereitgestellt, das an Dichte der Messpunkte mit den gerade entwickelten DNA-Arrays konkurrieren kann, ohne jedoch deren Beschränkung auf die DNA-Analyse und ohne die aufwendige und teure Gesamtchip- Synthese. Die Flexibilität und anwenderorientierte Ausbaubarkeit der einzelnen Komponenten stellen wesentliche Vorteile der Erfindung dar.

20

25

30

5.1 Farbcodierte SMART Beads für Absorptionsmessungen

Ein Vorteil der parallelen und direkten Detektion der SMART Beads auf einer Fläche, welche der Größe eines CCD-Chips von derzeit ca. 25 x 37 mm entspricht, liegt aus Sicht der Farbgebung in der moderaten Partikelgröße. So sind SMART Beads mit ca. 60 μm Durchmesser gut zu produzieren, farbkodieren, biochemisch zu labeln, fluidisch zu handhaben und sie liefern ein starkes Lichtsignal sowohl bei der SMART Bead Identifikation, als auch beim anschließenden Reaktionsnachweis.

Damit wird eine Absorptionsmessung als optisches Meßverfahren zur SMART Beads Identifikation überhaupt erst möglich, wobei die Absorptionsmessung die folgenden Charakteristika aufweist: Es ist eine sehr große Vielfalt an eindeutig meßbaren Farbvarianten (Abstufungen) erreichbar, was z.B. bei Fluoreszenzverfahren deutlich limitierter ist, und eine niedrigere optische Auflösbarkeit notwendig, d.h. die Partikel können größer sein, als dies beispielsweise bei einer Fluoreszenzmessung notwendig ist.

Diesen Charakteristika kommt die durch die Größe der CCD-Chips bedingte relative Größe der SMART Beads entgegen. So kann mit den SMART Beads eine sehr große Zahl an unterschiedlich farbcodierten Mikroträgern erzeugt werden, was besonders für eine Anwendung des Systems FSC in der DNA-Analytik interessant ist.

Das erreichbare Optimum an unterschiedlich farbigen SMART Beads beim FSC wird durch die folgenden Parameter bestimmt: Anzahl chemisch möglicher Farbgebungen zur eindeutigen Identifikation eines SMART Beads, minimal zulässige Größe für die fehlerfreie Identifikation (ausreichend starkes Lichtsignal) der SMART Beads,

und ausreichende Anzahl an CCD-Pixel pro SMART Bead zur fehlerfreien Identifikation.

5 Das Potential des Systems und ggf. die weitere Miniaturisierung der SMART Beads wird mit der weiteren Miniaturisierung, bei gleichzeitiger Steigerung der Empfindlichkeit, der CCD Sensoren automatisch vorangetrieben.

10 Die absolute Probenmenge liegt mit beispielsweise 3 ml für die Benetzung von ca. 200.000 Stück der 60 μ m SMART Beads in einem sehr vernünftigen Volumenbereich. Insbesondere ist es möglich, alle SMART Beads in die Messung einzubeziehen, also eine 100 % Messung aller SMART Beads durchzuführen, die für eine Absorptionsmessung eine lichtdurchlässige Färbung des Materials der SMART Beads oder eine lichtdurchlässige Färbung der Oberfläche der SMART Beads aufweisen.

20 Biochemische Verfahrensvorteile bei der Beschichtung der SMART Beads liegen in den nachfolgend aufgeführten Aspekten:

* Getrennte Synthese einzelner Spezies ermöglicht sehr unterschiedliche, immobilisierte Interaktionspartner an die Beads zu koppeln.

25 * Erstmals können DNA, PNA, Proteine etc. in einem Format vereinigt werden.

30 * Für die DNA Analytik, speziell die Bestimmung exprimierter Gene, ist die potentielle Ankopplung ganzer cDNAs oder EST's (expressed sequence tag) ein großer Vorteil gegenüber "klassischen" DNA Chips, da für die eindeutige Identifikation einer RNA oder DNA viel weniger

Messpunkte ausreichen, als dies mit Arrays kurzer Oligonukleotide der Fall ist (idealerweise nur ein Messpunkt).

5.2 Analytspezifisches Labeling (Beschichten) der farbigen SMART Beads

5

Vorteile bei der biochemischen Beschichtung der SMART Beads aus Sicht der Produktionstechnik liegen in der Möglichkeit des Multiplexing von Einsatzstoffen und Trägerpartikeln und der und parallelisierbaren Produktion im Hochdurchsatz- Batchverfahren. Dabei können alle Handhabungs- und Produktionsschritte fluidisch unter Ausnutzung physikalisch vorteilhafter Strömungsvorgänge durchgeführt werden. Weiterhin ist das Verfahren einfach und damit automatisierbar (Reduzierter Arbeitsaufwand und damit billiger in der Produktion).

15

Beim biochemischen Beschichten der SMART Beads in der Produktion können die Abläufe durch das flexible Multiplexing von Einsatzstoffen (z.B. G, A, C, T oder längere Oligo-Sequenzen) oder der Waschflüssigkeiten sowie der SMART Bead Klassen (Mikropartikel einer Farbe) einfach optimiert werden. D.h. es wird die effizienteste Kombination aus Parallelisierung der SMART Bead Bereitstellung, der Parallelisierung der Analyt-Bereitstellung und der frei wählbaren Chargengröße bei der Produktion im Batchverfahren hergestellt.

20

25 5.3 Optimale Strömungs- und Handhabungsvorgänge

Aus den günstigen strömungstechnischen Mischungsvorgängen resultiert eine sehr gute Benetzung der Oberflächen der SMART Beads mit den Bindungspartnern (Analyten) ebenso wie definierte Wasch- und Spülvorgänge. Daraus ergibt sich ein deutlich geringerer Einsatzstoffverbrauch, insbesondere im Vergleich mit den strömungstechnisch sehr ungünstigen, flächigen Verfahren, wie sie

30

bei planaren DNA-Chips auf einem Träger verwendet werden. Dadurch wird insgesamt eine sehr gute Reproduzierbarkeit und Qualitätssicherung erreicht.

5 Aufgrund der Größe der SMART Beads wird die Handhabung eines einzelnen SMART Beads vereinfacht, was sowohl in der Produktion, wie auch in der Analyse den Vorteil qualitativer Mischungs- und Trennungs- bzw. Sortiervorgänge beinhaltet. Bei sehr kleinen Partikeln ist hingegen nur eine quantitative Handhabung möglich. Das
10 bedeutet, es werden Fluidmengen mit einem statistisch ermittelbaren Anteil an Partikeln einer Klasse separiert oder vermischt. Die SMART Beads ermöglichen beide Verfahren mit ihren individuellen Vorteilen.

15 Die Vorteile des erfindungsgemäßen Systems gegenüber BioChips, welche schon in der Produktion im zweidimensional dicht gepackten Arrays erzeugt werden, sind daher einerseits überlegene Strömungsvorgänge, so daß weniger Probenmaterial benötigt und eine bessere Benetzung der Oberflächen der SMART Beads mit dem Probenmaterial erreicht wird. Dies ermöglicht eine Detektion seltener
20 Probenbestandteile mit niedriger Konzentration in der Probe. Andererseits können durch einfache und automatisierbare Strömungsvorgänge eine höhere Informationsausbeute und verlässlichere Ergebnisse erreicht werden.

25 5.4 ARRAY Anordnung und Detektion der SMART Beads

30 Das Meßprinzip der FSC-Technik nutzt das ständig wachsende Potential der hochauflösenden Bilderfassungssensoren und insbesondere der CCD-Chips zur parallelen Detektion einer Vielzahl an SMART Beads. Diese sollen vorzugsweise möglichst dicht in einem zweidimensionalen Array am optischen CCD-Chip-Sensor zur Detektion bereitgestellt werden (Präsentation am Detektor).

Bedingt durch die Nutzung eines CCD-Chips liegt der Fokus des Systems auf einer Parallelisierung der Detektion zur Durchsatzsteigerung. Gleichzeitig wird hiedurch nicht nur die Meßgeschwindigkeit erhöht, sondern auch die Meßqualität aufgrund einer Vielzahl möglicher, paralleler Referenzmessungen.

Somit wird ein möglichst dicht gepackter planarer Array aus SMART Beads erzeugt, in dem die einzelnen SMART Beads vorzugsweise direkt nebeneinander liegen, so daß sie mittels einer CCD-Kamera gleichzeitig detektiert werden können.

5.4.1 Identifikation von Kennung oder/und Lage der SMART Beads

Identifikation der Kennung der SMART Beads:

Es kann im Rahmen der Erfindung vorgesehen sein, daß die Mikropartikel (SMART Beads) in vorbestimmter geometrischer Anordnung auf den Träger positioniert werden.

In dieser Verfahrensvariante wird dem Array durch den Verfahrensschritt der Positionierung bzw. Präsentation eine geometrische Anordnung der Mikrobeads aufgeprägt, wobei die Identifikation der Mikrobeads aufgrund ihrer Farbe nur für die Unterscheidung der Mikrobead-Klassen genutzt wird, aber nicht für die Bestimmung der Lage der Mikrobeads, da diese ja durch die Gitterstruktur bereits vorgegeben ist.

Ein weiteres neues Verfahren, welches die SMART Beads bei der Präsentation für die anschließende Detektion bereits lagerichtig positionieren, ist das Spotten der SMART Beads auf einen Träger. Diese Vorgehensweise ist neuartig, da einzelne Mikropartikel gespottet werden und keine Flüssigkeit. Denkbare Träger sind Glas-

oder Kunststoffplättchen (Chips im eigentlichen Sinn), ein fortbewegtes Band, einer Folie auf dem Träger etc.

5 Alternativ kann ein kapillarer, zweidimensionaler, planarer Spalt (siehe Neubauer Kammer) verwendet werden, auf dessen Oberflächen ein hydrophobes Gitter aufgebracht ist, welches den im Spalt verteilten SMART Beads eine genaue Lage im Spalt zuweist.

10 Die im Vergleich mit der vorstehend erwähnten Verfahrensvariante mit vorbestimmter lagerichtiger Anordnung der SMART Beads wesentlich elegantere Methode nach der Erfindung ist eine nicht definierte, freie und immer wieder neue, sprich fraktale Anordnung der SMART Beads in einem zweidimensionalen Array, dem "Fraktal SMART Chip - FSC". Hier wird die hohe Auflösung der CCD-Chips
15 (Stand der Forschung Mai 1998: 81 Mio. Farbpixel) auch zur Lagedetektion genutzt. Die Präsentation der Beads kann dabei durch einen kapillaren, zweidimensionalen, planaren Spalt (siehe Neubauer Kammer), parallele Kapillaren (Zwangsprinzip in zwei Dimensionen, Lagedetektion nur in Strömungsrichtung notwendig), einen Ausstrich
20 oder Stempelverfahren (analog Blutausstrich) oder ein Ausrollen der SMART Beads erfolgen.

Durch dieses Meßprinzip entsteht der Array jedesmal neu und in undefinierter räumlicher Anordnung auf der Oberfläche des Detektors.
25 Die Identität der einzelnen Bindungsstellen wird durch den Bead-immanenten Code bestimmt und nicht durch eine vorgegebene Lokalisation auf einem Chip.

5.5 Parallele und dynamische Detektion

30

Ein weiteres Potential der Nutzung von flächigen CCD-Chips zur Detektion (kein Scannvorgang) von Mikropartikeln (SMART Beads) ist

die Möglichkeit, gleichzeitig das "Effizienzsteigerungspotential" einer dynamischen Detektion von bewegten SMART Beads zu nutzen. Damit werden die Potentiale von Geschwindigkeit und Parallelität in einem System vereinigt, was keines der drei beschriebenen bekannten Systeme ermöglicht.

Die dynamische (bewegte) Präsentation der SMART Beads am CCD-Chip Detektor erfolgt hierbei zum Beispiel in einer Vielzahl an Fluidkompartements oder Subräumen, die vorzugsweise als parallele Kanäle, z.B. als Kapillaren ausgebildet sind.

5.6 Direktdetektion ohne optisch vergrößernde Elemente

Die bevorzugte direkte Detektion der Durchlichtsignale (ohne Optik zwischen dem SMART Bead-Träger und dem Detektor, vorzugsweise einen CCD-Bildaufnehmer) hat den Vorteil einer wesentlich niedrigeren Energiemenge, welche das Licht für eine fehlerfreie Detektion benötigt. Optische Elemente zwischen CCD-Bildwandler und SMART Bead-Träger würden Licht absorbieren und somit die Empfindlichkeit der Meßeinrichtung reduzieren. Durch die geringere Lichtintensität werden unerwünschte Streulichteffekte, ebenso wie eine eventuelle notwendige Kühlung der verwendeten Lichtquelle, stark reduziert. Außerdem bedeutet der Wegfall einer Optik auch ein große Platzersparnis sowie eine Verringerung der Herstellkosten für die Detektionseinheit.

5.7 Identifikation und Nachweisverfahren "in one"

Die Verwendung moderner, hochparalleler CCD-Chips eröffnet die Möglichkeit, zusammen mit der Identifikation der SMART Beads nach Klasse und Lage im Array in einer Messung die jeweilige Nachweisreaktion zu detektieren.

Die Signaldetektion beruht hier auf der Kolokalisation eines spektral (farbig) markierten SMART Beads und eines durch Analytbindung generierten Signals. Damit kann zusätzlich zur Signaldetektion auch der unspezifische Hintergrund minimiert werden. Somit ist die
5 Detektion eines Lichtintensitätsunterschiedes oder einer Farbänderung aufgrund der erfolgten Reaktion auf der Oberfläche eines SMART Beads möglich. Natürlich muß eine eindeutige Unterscheidbarkeit trotzdem erhalten bleiben. So könnten sich die SMART Beads ohne Reaktion auf ihrer Oberfläche jeweils um 10 von
10 derzeit 4096 Intensitätsstufen in einem Farbkanal unterscheiden und die SMART Beads, welche ihren Bindungspartner gefunden haben, liegen durch die biochemische Reaktion um 2-3 Intensitätsstufen unter- oder oberhalb.

15 5.8 Disposable Chips - Keine Verschleppungen

Alle für das erfindungsgemäße System denkbaren Verfahren zur planaren Präsentation der SMART Beads zur direkten Detektion mit einem CCD-Chip können mit Ausnahme des Mikropartikelspottings,
20 einfach als Disposable Verfahren (Trägerchip als Einwegartikel) ausgeführt werden. Zwar werden auch photolithographisch hergestellte DNA-Chips als Wegwerfartikel angeboten, hier spricht jedoch der aufgrund der aufwendigen Herstellung der Chips sehr hohe Preis gegen das Wegwerfen nach nur einer Messung.

25

5.9 Flexibilität der Anwendung und Breite der Anwendungsfelder

Die Breite der Anwendung reicht von der Suche nach einem seltenen Bestandteil einer Probe, der Suche nach der "Nadel im Heuhaufen"
30 mit, im Extremfall, nur einer einzigen SMART Bead Klasse (eine Farbkodierung), bis zum Ultra High Throughput Screening - UHTS - mit immer nur je einem einzigen SMART Bead einer Klasse. Damit

werden alle bekannten und derzeit absehbaren Anwendungen von der "klassischen" Immunologie" bis zur modernen, zukunftsweisenden DNA-Analytik mit dem erfindungsgemäßen System ermöglicht.

5 Und wenn man mit dem Ergebnis einer Messung nicht zufrieden war, oder noch, durch die erste Messung aufgedeckter, spezifischer Klärungsbedarf besteht, so werden einfach noch zusätzliche SMART Beads zugeben und detektiert, was dem System ebenfalls einen enormen Flexibilitätsvorteil gegenüber bekannten GenChips
10 verschafft.

6 Überblick über einige bevorzugte Aspekte der Erfindung

6.1 Individuelle Kodierung der SMART Beads

15 Zur Farbkodierung kommen verschiedene Verfahren in Frage, z.B. eine lichtdurchlässige Färbung des Materials (z.B. Glas, Polysaccharid oder Kunststoff), aus welchem die SMART Beads (Mikropartikel) hergestellt werden, eine lichtdurchlässige Färbung der Oberfläche der SMART Beads und Inkubation der Beads mit geeigneten Farbstoffen,
20 eine Einbettung von Fluoreszenzfarbstoffen (bzw. Markern) in die SMART Beads, eine Einbettung von Absorptionsfarbstoffen in die SMART Beads oder die chemische Beschichtung der Partikeloberfläche mit einem Lumineszenzmarker.

25 Auch weitere Ordnungsprinzipien wie die Form oder Größe der Partikel oder elektromagnetische Eigenschaften sowie weitere Materialeigenschaften (magnetisch, nicht magnetisch) sind als Ergänzung denkbar.

30

6.2 Analytbestimmung

6.2.1 Analyten

5 Das erfindungsgemäße Verfahren ist zur Bestimmung beliebiger Analyten geeignet. Als Beispiele zu nennen sind Nukleinsäuren (DNA, RNA, in Spezialfällen auch PNA), Proteine, Polypeptide und Peptide in allen Erscheinungsformen, z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren, Enzyme, Tumorantigene, Serumfaktoren, Antikörper, Carbohydrate
10 in verschiedener Kombination, z.B. verschiedene Zucker in Lebensmitteln oder Agrarpflanzen, funktionelle Zucker, Polymere, Lipide, z.B. Steroide, 'second messenger', Membranlipide, Cholesterol, oder andere organische Moleküle, z.B. 'drugs of abuse', Pharmaka, Metabolite, Aminosäuren, Transmitter, Pestizide,
15 Insektizide, Lacke, verschiedene Toxine etc. Weiterhin können auch Zellen, subzelluläre Partikel oder virale Partikel bestimmt werden.

6.2.2 Varianten des immobilisierten Interaktionspartners

20 Die Bindung des Analyten an die Mikropartikel erfolgt über eine spezifische Bindung mit einem immobilisierten Interaktionspartner. Während einer einzigen Bestimmung erfolgt bei Verwendung mehrerer Klassen von Mikropartikeln die Bindung von verschiedenen Analyten an ihre jeweiligen Interaktionspartner. Das Verfahren erlaubt die
25 Verwendung unterschiedlicher Typen von Analytbindungsreaktionen, z.B. eine Hybridisierung von komplementären Nukleinsäuren, wobei längere Moleküle wie cDNA, synthetische Oligonukleotide, PNA, RNA als Interaktionspartner eingesetzt werden können. Der Analyt kann auch durch ein Rezeptor-Ligand- oder Antikörper-Antigen-Reaktionen
30 bestimmt werden, wobei z.B. natürliche Antikörper, rekombinante Antikörper und deren Untereinheiten, Antigene, allgemein Proteine und Polypeptide von Interesse als immobilisierter Interaktionspartner

eingesetzt werden. Auch Peptide z.B. synthetische Peptide, natürliche Peptide, können als immobilisierter Interaktionspartner verwendet werden. Desweiteren können Produkte der kombinatorischen Chemie direkt auf den Beads synthetisiert werden.

5

6.2.3 Varianten zur Signalerzeugung

Zwei Prinzipien zur Signalerzeugung werden vorrangig eingesetzt: die direkte Detektion eines vorher oder in der Reaktion markierten Analyten und die indirekte Detektion durch Competition des Analyten mit einem markierten Standard derselben Substanz. Die erste Variante ist für einige Anwendungen gut etabliert, für die Diagnostik z.B. von Serumkomponenten aber eher schlecht geeignet. Die zweite Variante ist für diese Anwendungen daher vorzuziehen, ausserdem erlaubt sie prinzipiell eine einfachere Probenvorbereitung durch den Anwender.

10
15

Die direkte Detektion kann durch Markierung der Analyten mit einem Fluoreszenzfarbstoff, einem Reporterenzym und anschließende Reaktion (z.B. Chemo- und Biolumineszenz) durch selektive Markierung des gebundenen Analyten, z.B. bei Nukleinsäuren durch interkalierende (Fluoreszenz-) Farbstoffe, Doppelstrang bindende Proteine oder Antikörper erfolgen.

20

Eine sekundäre Detektion ist durch Detektion des gebundenen Analyten mit einer zweiten Komponente, z.B. bei PNA-DNA Hybriden durch DNA spezifische Antikörper möglich.

25

Als markierte Standards für kompetitive Nachweisreaktionen können Farbstoff-, Fluoreszenz- oder Enzym-gekoppelte (z.B. Chemo- und Biolumineszenz mit alkalischer Phosphatase, Peroxidase etc) Analytmoleküle eingesetzt werden. Proteinstandards können als

30

Fusionsprotein mit Reporterenzym (siehe oben) oder autofluoreszierendem Protein (z.B. GFP), z.B. für rekombinante Antikörper, Protein-Hormone, Wachstumsfaktoren etc. hergestellt werden.

5

6.3 Präsentation der Beads zur Detektion

Für die Präsentation der SMART Beads für die optische Detektion mit einem CCD-Chip sind insbesondere die folgenden Ausführungsvarianten vorgesehen:

10

* Zweidimensionaler (planarer) kapillarer Spalt (siehe Neubauer-Kammer oder Thoma-Kammer):

15

Ggf. reichen die Kapillarkräfte zur Befüllung des Spaltes aus, ansonsten müssen die SMART Beads mit Überdruck an der Spalteintrittsseite und/oder Unterdruck an der Spaltaustrittsseite in den Spalt befördert werden. Desweiteren können die Kapillarkräfte, welche theoretisch bis zu 40 g erreichen können, auch durch ein entsprechend saugfähiges Material (Vlies) an der Spaltaustrittsseite verstärkt werden. Als Material für den Träger mit 2D Kapillare sind z.B. Glas oder Kunststoff möglich, wobei Träger mit Kapillare vor allem bei einer Spritzgußversion kostengünstig als Disposable (Einwegartikel) ausgeführt werden kann.

20

25

* Parallele Kapillaren in einem Glas- oder Kunststoffchip. Hier gelten ansonsten die identischen Rahmenbedingungen wie für den kapillaren Spalt, wobei diese Variante besonders für eine Messung von bewegten SMART Beads geeignet ist.

30

* Ausstrich oder Stempelverfahren basierend auf den Verfahren, welche für Blutausstriche verwendet werden.

* Spotten auf Träger, z.B. Glas- oder Kunststoffplättchen (auch Durchlichtmessung möglich), fortbewegtes Band aus geeignetem Material, Folie über Träger etc.

5 Das notwendige "Single Microparticle Handling" ist auch für die Sortiervorgänge bei der Zusammenstellung der einzelnen SMART Bead Kits einsetzbar.

6.4 Anregungs- und Detektionseinheit

10

Die Auslesung der Informationen aus einem SMART Bead Array soll günstigerweise in einer kombinierten Anregungs- und Detektionseinheit erfolgen, wobei als preferiertes System eine Anordnung der Anregungslichtquelle direkt über dem SMART Bead Array und des CCD-Chips direkt unter (bzw. umgekehrt) dem Array angeordnet wird (Sandwichbauweise). Durch diese möglichst kompakte Bauweise werden die Lichtlaufwege und damit auch die benötigte Lichtintensität, ebenso wie Überlagerungseffekte benachbarter SMART Beads, minimiert. Auf die Verwendung einer aufwendigen, platzintensiven, lichtschluckenden und teuren Optik soll
15
20 sowohl auf der Anregungs-, als auch auf der Detektionsseite vorzugsweise verzichtet werden.

Ein weitere Variante ist eine vertikale Ausrichtung des Chips, so daß
25 auch Gravitationskräfte für die Be- und Entladung des Chips mit den SMART Beads genutzt werden können.

6.4.1 Anregungslichtquelle

30 Als Lichtquellen kommen je nach Farbkodierung der SMART Beads (Absorption oder Fluoreszenz etc.) und der gewählten Nachweismethode (Fluoreszenz oder Lumineszenz etc.) für zum

Beispiel eine Analytbindung, hochparalleles Licht aus einer Lampe (Weißes Licht), hochparalleles Licht aus einer Blitzröhre, hochparalleles monochromatisches Licht, ein monochromatischer Laserlichtstrich (lokale Anregung entspricht dem Scannerprinzip und nutzt damit nicht mehr die Parallelität der CCD-Kamera), oder ein monochromatischer Laserstrahl (lokale Anregung entspricht dem Scannerprinzip und nutzt damit nicht mehr die Parallelität der CCD-Kamera) in Frage.

Dabei kann sich entsprechendes optisches Gitter, und/oder eine entsprechende Optik zwischen Anregungslichtquelle und SMART Bead-Chip befinden.

6.4.2 CCD-Kamera Detektion

Die Detektionseinheit umfaßt einen CCD-Chip. Diese haben aktuell auf einer Fläche von ca. 25 x 37 mm etwa 2000 x 3000 Farbpixel, was 6 Mio. Farbpixeln oder 18 Mio. Einzelpixeln (RGB-Prinzip durch miniaturisierte Farbfilter vor den Pixeln) entspricht (Firma Cannon). Ordnet man auf einer solchen Fläche von 25 x 37 mm Mikropartikel (SMART Beads) mit einem Durchmesser von 60 μm zur Direktdetektion an, so erhält man min. 200.000 Mikropartikel (SMART Beads). Jeder Mikropartikel überdeckt dabei ca. 40 quadratische Farbpixel mit 9 bis 10 μm Kantenlänge. Damit erhält man 40 Farb- oder 120 Schwarzweiß-Signale pro SMART Bead mit einer digitalen Lichtintensitätsabstufung von 4096 diskreten Helligkeitsstufen je Schwarzweiß-Pixel. Somit ist auf jeden Fall eine ausreichende Menge an Daten für eine statistische Signalverifizierung vorhanden.

Die Grenze der maximal synchron detektierbaren, unterschiedlich farbkodierten SMART Beads liegt in der Möglichkeit der spezifischen

Kodierbarkeit (chemisches Limit der reproduzierbaren Farberzeugung) der SMART Beads sowie in der Möglichkeit der optischen Erfassung der Farbunterschiede mit einem CCD-Chip. Teilt man 256 Intensitätsstufen je Farbe (RGB) in 10 Stufen ein, so erhält man 25^3
5 = 15.625 mögliche Farben, welche detektiert werden können. Baut man die Anzahl der Farbklassen durch weitere Farbfilter aus, so läßt sich die Zahl der detektierbaren Farben weiter erhöhen. Mit vierfach Farbfiltern (z.B. RGB und Magenta) vor dem oben beschriebenen CCD-Chip ließen sich theoretisch $25 * 25^3 = 390.625$ Farben
10 erkennen. Natürlich nur noch mit ca. 30 vierfach Farbpixeln. Aufgrund der großen Fortschritte in der CCD Technologie ist mit den aufgeführten Zahlen nur der aktuelle Stand der Technik beschrieben. Erste Prototypen haben bereits auf der gleichen Fläche 81 Mio. Pixel. Damit ergibt sich auch für die beschriebene Applikation der CCD-Chip
15 Technologie ein großes Wachstumspotential und die parallele Detektion von 10^6 individuellen SMART Beads ist technisch machbar.

Gegebenenfalls kann sich entsprechendes optisches Gitter, und/oder eine entsprechende Optik zwischen SMART Bead-Array und
20 CCD-Kamera Chip befinden.

6.4.3 Parallele Inspektionseinheit

Ein besonders interessanter Aspekt im Rahmen der vorliegenden
25 Erfindung ist die Verwendung einer "parallelen Inspektionseinheit".

Hierbei handelt es sich um eine Lichtemissions-Detektionseinrichtung mit einer steuerbaren Lichtquellenmatrix, die z.B. eine Reflektormatrix, eine Lichtventilmatrix (z.B. LCD) oder
30 selbstleuchtende Belichtungsmatrix sein kann, und einer der Lichtquellenmatrix zugewandt-gegenüberliegenden Lichtsensormatrix, nämlich dem CCD-Bildaufnehmer, wobei der Träger mit den darauf

bzw. darin befindlichen SMART-Beads zwischen der Lichtquellenmatrix und dem CCD-Sensor anzuordnen ist.

5 Eine Stärke dieser Inspektionseinheit sind die flexiblen Möglichkeiten, welche sich aus der Kombination von (örtlich oder/und zeitlich) gezielter Anregung und gezielter Detektion in Verbindung mit modernen Hochleistungsrechnern für die Ansteuerung und die Signalauswertung ergeben. Damit wird gerade für optische Nachweis- und Detektionsverfahren eine neue Technologieplattform geschaffen.

10 Durch das "Durchtunen" oder "Abrastern" der einzelnen Lichtpunkte bzw. Lichtpunktzeilen im Zusammenspiel mit der CCD-Detektion und geeigneten Algorithmen zur Signalauswertung sind kleinste Veränderungen in den einzelnen Meßpunkten im "LCD-CCD-Lichtgitter" (Inspektionseinheit) möglich. Im Bereich der DNA-Analytik

15 ist im Rahmen der Erfindung die direkte Detektion einer Hybridisierung auf einen Meßplatz denkbar. Die LCD-Einheit als zweidimensionale Lichtquellenmatrix kann sowohl als Lichtquelle für Absorptionsmessungen zur jeweiligen Ortsbestimmung als auch zur Fluoreszenzanregung bei der Analytbestimmung (ggf. mit anderer

20 Hintergrundbeleuchtung) herangezogen werden.

7. Anmerkungen

Gegebenenfalls selbständige Bedeutung kommt folgenden Varianten

25 bzw. Abänderungen des Verfahrens nach der Erfindung zu:

Das Verfahren nach Anspruch 1 kann in folgender Weise abgeändert werden: Der Schritt des Aufbringens der Mikropartikel auf einen Träger gemäß Merkmal b) kann vor dem Schritt a) des

30 Inkontaktbringens der Probe mit einer Vielzahl von Spezies von Mikropartikeln erfolgen. Bei der vorstehend genannten Variante des Verfahrens wird als Träger ein planarer Träger bzw. ein Chip,

vorzugsweise mit Kapillarspalt, verwendet, wobei ein solcher flacher (ggf. hohler) Plattenträger unmittelbar mit dem CCD-Bildaufnehmer gekoppelt werden sollte, um eine unvergrößert-bildweise Detektion des Geschehens bei dem Inkontaktbringen der Mikropartikel mit der Probe durchführen zu können.

Gegebenenfalls selbständige Bedeutung kommt auch dem Aspekt der Detektion bzw. Observation der SMART-Beads mittels CCD-Bildaufnehmern bei einem sich bewegenden Ensemble von SMART-Beads zu, wobei für derartige dynamische Messungen insbesondere Träger mit Kapillaren in Frage kommen.

8. Exemplarische Ausführungsformen

8.1 Gefärbte Mikropartikel

Partikel von Chromatographimatrixen, z.B. DEAEI-Sepharose, Sephacryl, Sephadex oder Sephacel, wurden durch 5 min Inkubation mit den Farbstoffen Eosinrot, Evansblau und Lichtgrün angefärbt. Dabei wurden eingefärbte Beads erhalten, die im Durchlichtverfahren eindeutig klassifiziert werden konnten.

8.2 Lichtquellen

Als Lichtquellen geeignet haben sich Xenon- und Halogenlampen, sowie Kaltlichtquellen erwiesen.

Durch Einbau einer Optik zwischen Lichtquelle und Träger konnte die Parallelität des auf den Träger auftreffenden Lichts verbessert werden. Geeignete Optiken waren beispielsweise eine 80 bis 200 nm Teleoptik (Photoobjektiv Tokina), eine achromatische Teleoptik (Teleobjektiv 300 mm Achromat) oder ein Kollimator (Melis-Criot).

Weiterhin wurde die LCD-Matrix LCX017AL (Sony) mit einer Chipfläche von 60 mm² (Diagonale 46 mm, Seitenverhältnis 5:4), einer Pixelzahl von 786 432 (entsprechend einer Pixelfläche von 830 µm²) erfolgreich getestet.

5

8.4 CCD-Chip

Es wurde der CCD-Chip ICX085AK (Sony) mit einer Diagonale von 16, 933 mm, einem Seitenverhältnis 5:4 (10,57 mm x 8,5 mm) und einer Anzahl effektiver Pixel von 1300 x 3030 (berechnete Pixelfläche 7,97 µm²) erfolgreich getestet.

10

Die Erfindung wird anhand eines Beispiels nachstehend unter Bezugnahme auf die Figuren näher erläutert.

15

Fig. 1 zeigt ein Schaubild zur Erläuterung einer Ausführungsform des Verfahrens nach der Erfindung.

20

Fig. 2 zeigt in einer vereinfachten perspektivischen Darstellung eine Detektionseinheit aus CCD-Bildaufnehmer und Meßsubstansträger.

Fig. 3 zeigt eine Draufsicht auf den Meßsubstansträger nach Fig. 2.

25

Fig. 4 zeigt einen Schnitt durch den Meßsubstansträger längs der in Fig. 3 bei IV-IV angedeuteten Schnittebene.

30

Fig. 5 zeigt schematisch eine Inspektionseinheit aus LCD-Matrix (Flüssigkristallanzeigenmatrix), Trägerchip gemäß Fig. 2 und CCD-Matrix in einer Sandwichanordnung.

Gemäß Fig. 1 wird in einem Schritt A das Probenmaterial 1 mit den präparierten Mikropartikeln (SMART Beads) in einer Mischvorrichtung 5 vermischt. Das hierzu eingebrachte Ensemble von Mikropartikeln 3 umfaßt eine Vielzahl unterschiedlich eingefärbter, transparenter Mikropartikel 3, wobei Mikropartikel 3 gleicher Einfärbung zu einer Spezies gehören, die die gleichen an den Mikropartikeln 3 immobilisierten Fängermoleküle (z.B. Oligonukleotide) aufweist. Das Vorhandensein der in der Probe befindlichen Zielanalyten wird durch Verwendung analytspezifischer markierter Nachweisreagenzien in löslicher Form, mit deren Hilfe eine Bindung der Zielanalyten an die Beads erfaßt werden kann, nachgewiesen.

Während des Schrittes A können sich dann unter Hybridisierungsbedingungen die jeweils passenden Zielanalytmoleküle an die Fängermoleküle auf der Oberfläche der betreffenden Mikropartikel (SMART Beads) anlagern.

Gemäß Fig. 1 kann dem Vermischungsschritt A ein Amplifikationsschritt (z.B. PCR-Amplifikation etc.) folgen.

Die Meßsubstanz aus den mit der Probe 1 in Kontakt gebrachten Mikropartikeln 3 wird auf einem Meßsubstanzträger 7 in eine planare Anordnung mit willkürlicher Verteilung der Mikropartikel 3 gebracht. Der Meßsubstanzträger 7 kann im einfachsten Fall eine Glasplatte oder transparente Kunststoffplatte sein, auf die die Mikropartikel-Meßsubstanz 3 z.B. ausgestrichen, ausgerollt oder ggf. gestempelt wird.

Gemäß dem Schritt C in Fig. 1 erfolgt in einem ersten Meßdurchgang eine bildweise Absorptionsmessung des auf dem Meßsubstanzträger 7 angeordneten Ensembles aus Mikropartikeln 3, wobei als Bilderfassungssensor ein CCD-Bildaufnehmer 9 verwendet wird. Im gezeigten Beispiel befindet sich der Meßsubstanzträger 7 zwischen dem CCD-Bildaufnehmer und einer spektral breitbandig emittierenden Lichtquelle

11, die in Fig. 1 mit einem Glühlampensymbol angedeutet ist. Vorzugsweise wird bei der Absorptionsmessung gemäß Schritt C eine Durchleuchtung des Meßsubstansträgers 7 und der darauf vorgesehenen Meßsubstanzschicht mit parallelem Licht der Lichtquelle 11 vorgenommen. Der CCD-Bildaufnehmer 9 erfaßt dabei ein Bild des Ensembles von Mikropartikeln 3 auf dem Meßsubstansträger 7, wobei eine Datenverarbeitungs- und -steuereinrichtung 13 die Bilddaten des CCD-Bildaufnehmers auswertet, um abzuspeichern, an welchen Bildpunktorten des CCD-Bildaufnehmers 9 welche Mikropartikel 3 bestimmter Färbung registriert wurden.

10

Wie in Fig. 1 angedeutet, ist die Größe der Mikropartikel 3 so gewählt, daß jedes Mikropartikel 3 mehrere Pixel (Bildpunktsensoren) 15 des CCD-Bildaufnehmers 9 in der Draufsichtprojektion überdeckt.

15 Nachdem im Schritt C die verschiedenen Mikropartikel-Spezies in Zuordnung zu ihrer Lage in dem aufgenommenen Bild identifiziert worden sind, erfolgt im Schritt D die Detektion der Nachweisreaktion. Im Beispielsfall erfolgt der Reaktionsnachweis durch Fluoreszenzsignale, welche von Mikropartikeln 3 ausgehen, an den sich analytspezifische Nachweisreagenzien angelagert haben. Als Fluoreszenzanregungslichtquelle dient eine UV-Lichtquelle 17, die in Fig. 1 durch ein Glühlampensymbol dargestellt ist und die paralleles Licht abgibt. Die Fluoreszenzstrahlung wird mittels dem Bildaufnehmer 9 in Zuordnung zur Lage der jeweiligen fluoreszierenden Mikropartikel 3 registriert. Das Datenverarbeitungssystem kann dann aus den Ergebnissen der Schritte C und D ermitteln, zu welcher Spezies von Mikropartikeln 3 das bzw. die Mikropartikel 3 gehören, welche ein betreffendes Fluoreszenzsignal abgegeben haben. Da so identifizierte Mikropartikel 3 bzw. die daran immobilisierten Fängermoleküle nur mit einem bestimmten Zielanalyten aus der Probe reagiert haben können, steht somit fest, daß der Zielanalyt in der Probe vorhanden war.

20

25

30

Fig. 2 zeigt einen Meßsubstansträger-Chip 7a in der Meßanordnung an einem CCD-Bildaufnehmer 9. Der Meßsubstansträger-Chip 7a (auch als Fraktal SMART Chip bzw. FSC bezeichnet) ist ferner in Fig. 3 in Draufsicht dargestellt. Der Chip 7a weist einen scheibenförmigen kapillaren Spalt oder Hohlraum 19 auf, der unten und oben in der Darstellung gemäß Fig. 2 durch transparente Plattenabschnitte 21, 23 begrenzt ist. Die Spalthöhe h (vgl. Fig. 4) ist so gewählt, daß sie größer ist als der mittlere Durchmesser D der Mikropartikel 3 und kleiner ist als der doppelte Durchmesser ($2 D$) der Mikropartikel 3, so daß jeweils nur eine Schicht nebeneinander liegender Mikropartikel 3 zwischen den Plattenabschnitten 21, 23 in dem Kapillarspalt 19 Platz hat.

Der Meßsubstansträger-Chip 7a weist an seinem rechten Ende gemäß Fig. 3 und 4 eine Probeneingabe 25 für die Zuführung der Meßsubstanzen (Mikropartikel 3 nach Vermischen mit der Probe) auf. Die Probeneingabe 25 steht mit dem Kapillarspalt 19 in Verbindung. Wie aus Fig. 3 zu ersehen, erstreckt sich der Kapillarspalt 19 flächenhaft über einen Detektionsbereich 27, der gemäß Fig. 2 mit dem bei 29 angedeuteten aktiven Bilderfassungsfeld des CCD-Bildaufnehmers 9 fluchtet, wenn Bildaufnehmer 9 und Trägerchip 7a zu der in Fig. 2 gezeigten Detektionseinheit zusammengefügt sind.

An der in den Fig. 2 und 3 links liegenden Austrittsseite des Kapillarspaltes 19 ist im gezeigten Beispiel ein saugfähiges Material 30 in einer Kammer des Chip 7a vorgesehen, welches die Kapillarkräfte zur Befüllung des Spaltes 19 mit Meßsubstanzen durch seine Saugwirkung verstärkt. Der Meßsubstansträger 7a ist vorzugsweise aus Kunststoff in Spritzgußversion gefertigt, so daß er kostengünstig als Einwegartikel (Disposable) verwendet werden kann.

30

Nachzutragen ist noch, daß die Größe des Detektionsbereichs 27 des Chip 7a im wesentlichen der Größe des aktiven Bilderfassungsfeldes 29 des

CCD-Sensors entspricht. Bei einer Ausführungsform hat der Detektionsbereich die Abmessungen 2,5 cm x 3,7 cm.

Fig. 5 zeigt schematisch die Anordnung nach Fig. 2 mit einer LCD-Matrix 35
5 als zweidimensionale Meß- bzw. Anregungslichtquelle, deren Lichtquellenelemente gezielt nach Intensität und Farbe des Lichtes orts- und zeitabhängig gesteuert werden können, wobei die betreffende Steuereinrichtung gemeinsame Steuereinrichtung für die LCD-Matrix und die CCD-Matrix ist.

Ansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe
5 umfassend die Schritte:
- (a) Inkontaktbringen der Probe mit
- (i) einer Vielzahl von Spezies von Mikropartikeln (3), wobei
jede Spezies zum Nachweis von bestimmten Analyten geeignet
10 ist und eine bestimmte, von anderen Spezies optisch unter-
scheidbare Codierung aufweist, und
- (ii) einer Vielzahl von löslichen analytspezifischen Nach-
weisreagenzien, die eine signalgebende Gruppe tragen oder mit
einer signalgebenden Gruppe bindefähig sind,
- 15
- (b) anschließendes Aufbringen der Mikropartikel (3) auf einen
Träger (7; 7a) und mindestens
- (c) Bestimmen der Analyten durch optisches Erfassen der Codie-
20 rung und der Menge, des Vorhandenseins oder/und der Ab-
wesenheit der signalgebenden Gruppen auf mindestens einer
Spezies von individuellen Mikropartikeln (3) auf dem Träger (7;
7a).
- 25 2. Verfahren nach Anspruch 1,
- dadurch gekennzeichnet, daß die Analyten ausgewählt werden aus
Zellen, subzellulären Partikeln, Nukleinsäuren, Polypeptiden, Peptiden,
Glykoproteinen, Lipoproteinen, Mono-, Oligo- und Polysacchariden,
Lipiden, Metaboliten, Hormonen, Mediatorsubstanzen, Neurotrans-
30 mittern, Pestiziden, Insektiziden, toxischen Substanzen, pharmazeu-
tisch wirksamen Substanzen und Kombinationen davon.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß man als Probe eine biologische Probe
ausgewählt aus Körperflüssigkeiten wie Serum, Blut, Plasma, Urin,
Lymphe, Cerebrospinalflüssigkeit, Sperma, Speichel und dgl., Gewe-
5 ben, Gewebeextrakten, Zellen, Zellextrakten, pflanzlichen Proben,
Umweltproben und Fäkalienproben verwendet.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 3,
dadurch gekennzeichnet, daß man Mikropartikel (3) ausgewählt aus
10 organischen Partikeln wie organischen Polymerlatices, oder
Polysaccharidpartikeln, anorganischen Partikeln wie Magnetpartikeln
und Glaspartikeln, und organisch-anorganischen Verbundpartikeln
verwendet.
- 15 5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß optisch transparente oder optisch
nichttransparente Mikropartikel (3) verwendet werden.
6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
20 dadurch gekennzeichnet, daß man eine Anzahl von bis zu 10^6
Spezies von Mikropartikeln (3) verwendet.
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß jede Spezies von Mikropartikeln (3) auf
25 ihrer Oberfläche mindestens einen immobilisierten, unterschiedlichen,
analytspezifischen Rezeptor enthält.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet, daß die immobilisierten, analytspezifischen
30 Rezeptoren ausgewählt werden aus Nukleinsäuren wie DNA und
RNA, Nukleinsäureanaloga wie peptidischen Nukleinsäuren (PNA),

Antikörpern, Antikörperfragmenten, Antigenen, Peptiden, Haptenen und synthetischen Rezeptoren.

- 5 9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die Codierung der Mikropartikel (3)
durch Farbcodierung, z.B. durch Einfärbung des Materials, Färbung
der Oberfläche oder/und Einbettung von Farbstoffen erzeugt wird.
- 10 10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung (6) auf mindestens 2
Spezies unterschiedlicher Mikropartikel erfolgt.
- 15 11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung jedes Analyten minde-
stens ein lösliches analytspezifisches Nachweisreagenz verwendet
wird, ausgewählt aus analytspezifischen Rezeptoren und Analytanalo-
ga.
- 20 12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, daß die löslichen analytspezifischen Nach-
weisreagenzien ausgewählt werden aus Nukleinsäuren wie DNA und
RNA, Nukleinsäureanaloge wie peptidischen Nukleinsäuren (PNA),
Antikörpern, Antikörperfragmenten, Antigenen, Peptiden, Haptenen
und synthetischen Rezeptoren.
- 25 13. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die löslichen analytspezifischen Nach-
weisreagenzien direkt mit einer signalgebenden Gruppe gekoppelt
sind.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 12,
dadurch gekennzeichnet, daß die löslichen analytspezifischen Nach-
weisreagenzien eine mit einer signalgebenden Gruppe, vorzugsweise
über eine hochaffine biologische Wechselwirkung bindefähige Gruppe
5 tragen.
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14,
dadurch gekennzeichnet, daß man für die Bestimmung mehrerer
Analyten eine gleiche signalgebende Gruppe verwendet.
10
16. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß man als signalgebende Gruppe eine
Lumineszenz-, Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzgruppe, verwendet.
- 15 17. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekenn-
zeichnet, daß man einen planaren Träger (7) verwendet.
18. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß man einen Träger (7) verwendet, der
20 eine Oberfläche ausgewählt aus Kunststoffen, Glas, Halbleitermate-
rialien und Metallen aufweist.
19. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet, daß man als Träger einen Chip (7a) ver-
25 wendet.
20. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß man einen optisch transparenten Träger
(7; 7a) verwendet.
30

21. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß man einen Träger mit strukturierten
Oberflächenbereichen verwendet.
- 5 22. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß das Aufbringen ein Aufstreichen,
Ausrollen, Stempeln oder Spotten einer die Mikropartikel enthalten-
den Suspension auf den Träger (7) umfaßt.
- 10 23. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß das Aufbringen eine Wanderung der
Mikropartikel auf dem Träger (7a) über Kapillarwirkung umfaßt.
24. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
15 dadurch gekennzeichnet, daß das Bestimmen an einer statischen oder
einer dynamischen Anordnung der Mikropartikel auf dem Träger
erfolgt.
25. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
20 dadurch gekennzeichnet, daß das Bestimmen mittels hochauflösender
Bilderfassungsmittel (9), z.B. einem CCD-Sensor, erfolgt.
26. Verfahren nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet, daß die Größe der Mikropartikel (3) so
25 gewählt ist, daß ein jeweiliges Mikropartikel (3) eine Fläche von
mindestens 2, vorzugsweise von mindestens 4, besonders bevorzugt
von mindestens 9 und am meisten bevorzugt von mindestens 16
einzelnen Pixeln überdeckt.

27. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel (3) einen mittleren
Durchmesser von mindestens 10 μm , vorzugsweise von mindestens
20 μm und besonders bevorzugt von 25 μm - 80 μm aufweisen.
- 5
28. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 27 für die
Diagnostik klinischer Parameter, z.B. für die Nukleinsäure-Diagnostik,
für die biologische Grundlagenforschung, für die Forensik, für die
Lebensmittelanalytik und für das Screening von medizinischen Pro-
dukten.
- 10
29. Kit, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach
einem der Ansprüche 1 - 27 umfassend:
- 15
- (a) eine Vielzahl von Spezies von Mikropartikeln (3) in freier
Form, wobei jede Spezies zum Nachweis von bestimm-
ten Analyten geeignet ist und eine bestimmte, von
anderen Spezies optisch unterscheidbare Codierung
aufweist,
- 20
- (b) eine Vielzahl von löslichen analytspezifischen Nachweis-
reagenzien und
- (c) einen Träger (7; 7a).
- 25
30. Meßeinrichtung zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer
Probe, insbesondere nach dem Verfahren nach wenigstens einem der
Ansprüche 1 - 27, umfassend
- einen elektronischen Bilderfassungssensor (9) zur im wesentli-
chen unvergrößert-bildweisen Detektion des optischen Verhal-
tens eines Ensembles von mit der Probe in Kontakt
- 30

- gebrachten, auf einen Träger (7; 7a) aufgebracht Mikropartikeln (3),
- Mittel (17) zur Anregung der Signalabgabe signalgebender Gruppen an Mikropartikeln (3) in dem Ensemble von Mikropartikeln auf dem Träger (7; 7a),
 - eine Bilddaten des elektronischen Bilderfassungssensors auswertende Datenverarbeitungseinrichtung (13) zur Bereitstellung von Informationen über das Vorhandensein bestimmter Analyten in der Probe auf der Basis des detektierten optischen Verhaltens des Ensembles von Mikropartikeln (3).

31. Meßeinrichtung nach Anspruch 30, wobei der Bilderfassungssensor (9) ein CCD-Bildaufnehmer ist.
32. Meßeinrichtung nach Anspruch 30 oder 31, wobei die Mikropartikel (3) farbcodiert sind und wobei der Bilderfassungssensor (9) zur Erfassung von Farbunterschieden von Bildpunkten des jeweils aufgenommenen Bildes eines Ensembles von Mikropartikeln (3) in Zuordnung zur Lage der detektierten Bildpunkte geeignet ist, um die Lage von Mikropartikeln (3) jeweils gleicher Farbcodierung auf dem Träger (7; 7a) für die bildweise Detektion des optischen Verhaltens des Ensembles von Mikropartikeln bestimmen zu können.
33. Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 32, umfassend wenigstens eine Lichtquelle (11) zur Bereitstellung von insbesondere spektral breitbandigem Licht zur parallelen Messung des optischen Absorptionsverhaltens oder Reflexionsverhaltens der einzelnen Individuen des Ensembles von Mikropartikeln (3) mittels des Bilderfassungssensors (9).
34. Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 33, wobei die Einrichtung zur Anregung der Signalabgabe (17) wenigstens eine

- 5 Lichtquelle zur Fluoreszenzanregung wenigstens einer Spezies von Mikropartikeln (3) mit signalgebender Gruppe umfaßt und wobei der Bilderfassungssensor (9) zur Detektion des Fluoreszenzlichtes in Zuordnung zur Lage der Bildpunkte etwaig fluoreszierender Individuen bei der bildweisen Detektion des optischen Verhaltens des jeweiligen Ensembles von Mikropartikeln (3) geeignet ist.
- 10 35. Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 34, wobei die Mikropartikel (3) hinsichtlich ihrer Form codiert sind und wobei die optische Meßeinrichtung aus Bilderfassungssensor (9) und Datenverarbeitungseinrichtung (13) dazu geeignet ist, die einzelnen Spezies von Mikropartikeln (3) aufgrund der unterschiedlichen Formkonturen im jeweils aufgenommenen Bild zu unterscheiden.
- 15 36. Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 35, wobei der Träger ein insbesondere planares Fenster des Bilderfassungssensors ist, welches das Bildaufnahmefeld des Bilderfassungssensors nach außen hin überdeckt.
- 20 37. Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 36, wobei der Träger (7) und der Bilderfassungssensor (9) in definierten Lagen relativ zueinander an einem gemeinsamen Haltemittel oder unmittelbar aneinander auswechselbar fixierbar sind.
- 25 38. Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 37, wobei der Träger (7a) wenigstens einen Strömungspfad für die Mikropartikel (3) aufweist und wobei die Meßeinrichtung dazu eingerichtet ist, die bildweise Detektion des optischen Verhaltens der Mikropartikel (3) während der Bewegung des Ensembles von Mikropartikeln (3) längs
30 des Strömungspfades durchzuführen.

39. Träger zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 27, insbesondere für eine Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 38, wobei der Träger (7a) einen Hohlraum (19), insbesondere flächig ausgedehnten Kapillarspalt zur Aufnahme des Ensembles von Mikropartikeln (3) zwischen zwei mit ihren Flachseiten einander gegenüberliegenden Platten (21, 23) aufweist, von denen wenigstens eine transparent ist.
40. Träger nach Anspruch 39, wobei der Abstand zwischen den beiden Platten so gewählt ist, daß in den Hohlraum (19) jeweils nur eine Schicht von nebeneinander liegenden Mikropartikeln paßt.
41. Träger nach Anspruch 39 oder 40, wobei der Abstand zwischen den Platten (21; 23) wahlweise einstellbar ist.
42. Träger zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 27, insbesondere für eine Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 38, wobei der Träger eine Vielzahl insbesondere parallel zueinander verlaufender Kapillarkanäle aufweist und zumindest im Bereich der Kapillarkanäle optisch transparent ist.

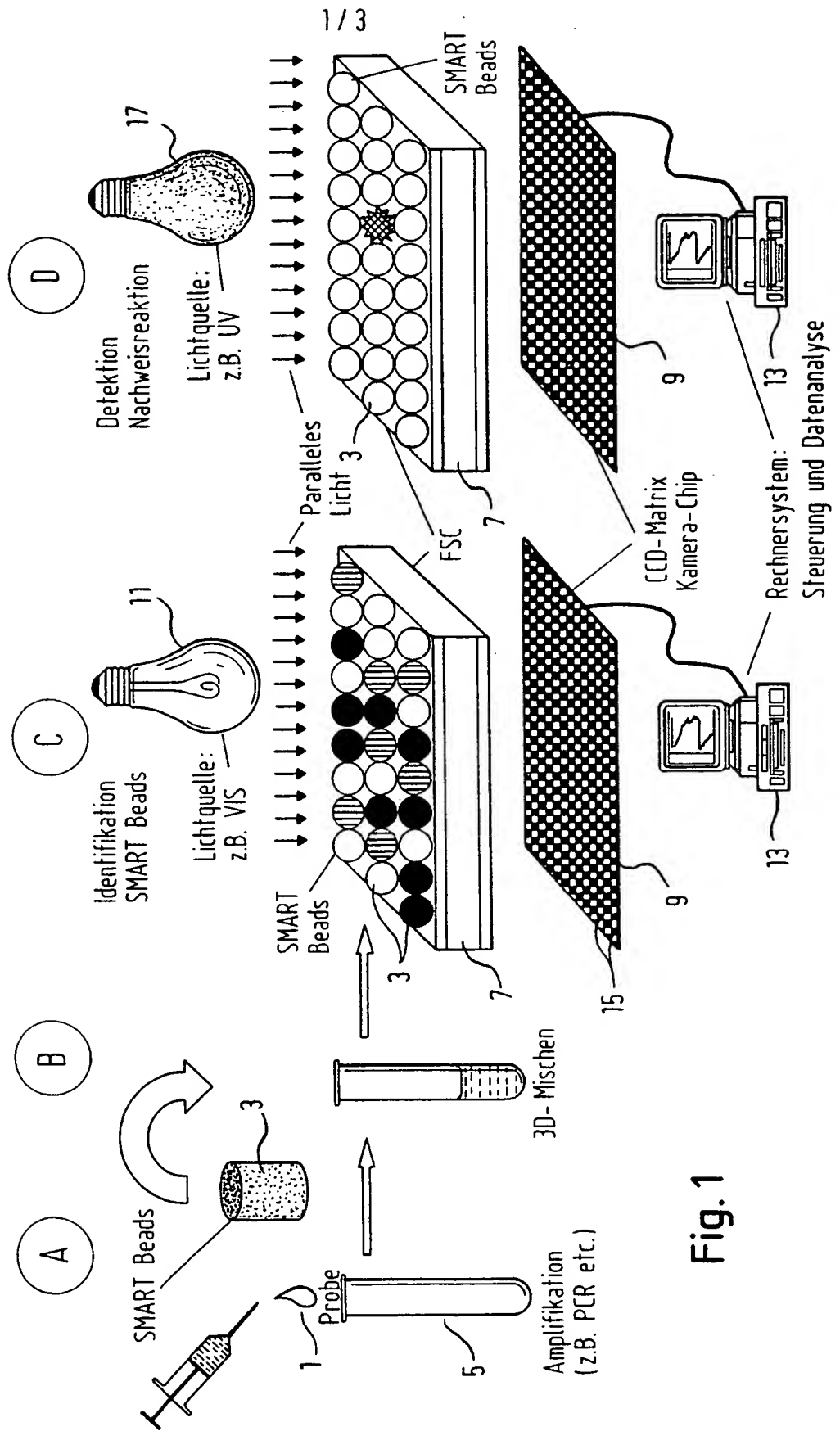
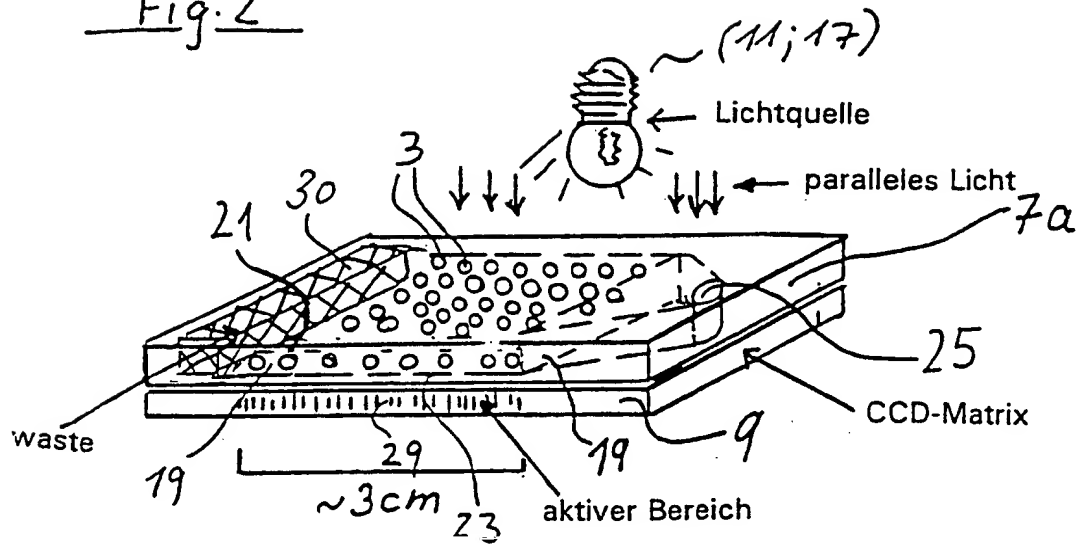
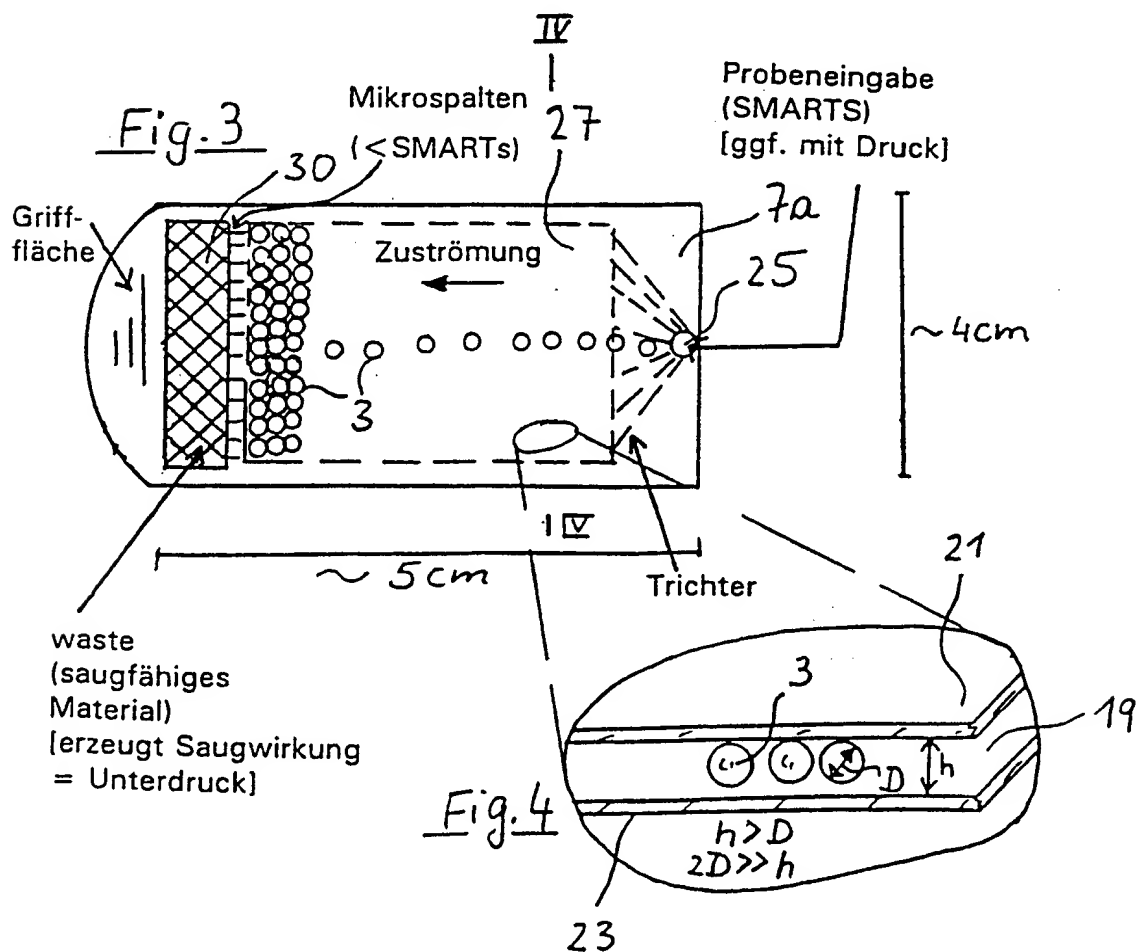
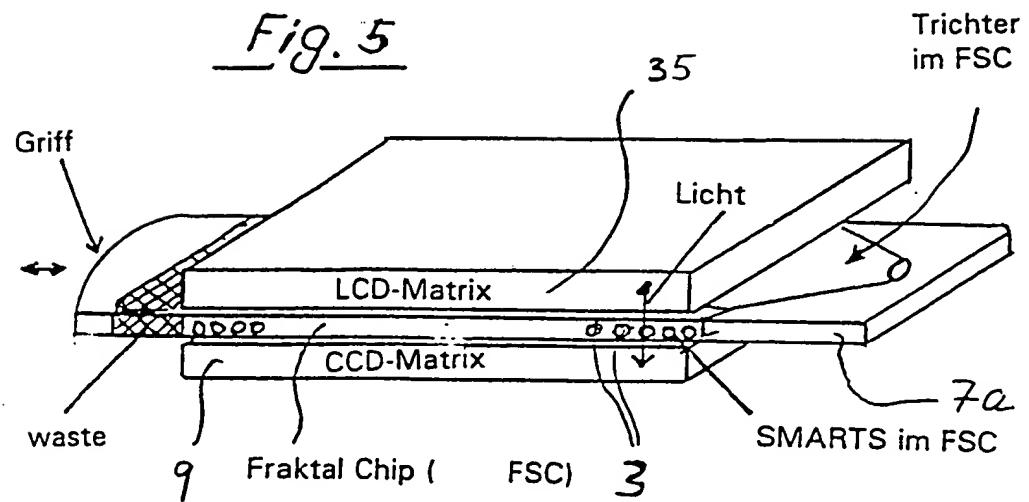


Fig. 1

Fig. 2

Detektion im Durchlichtverfahren (direkte Detektion)





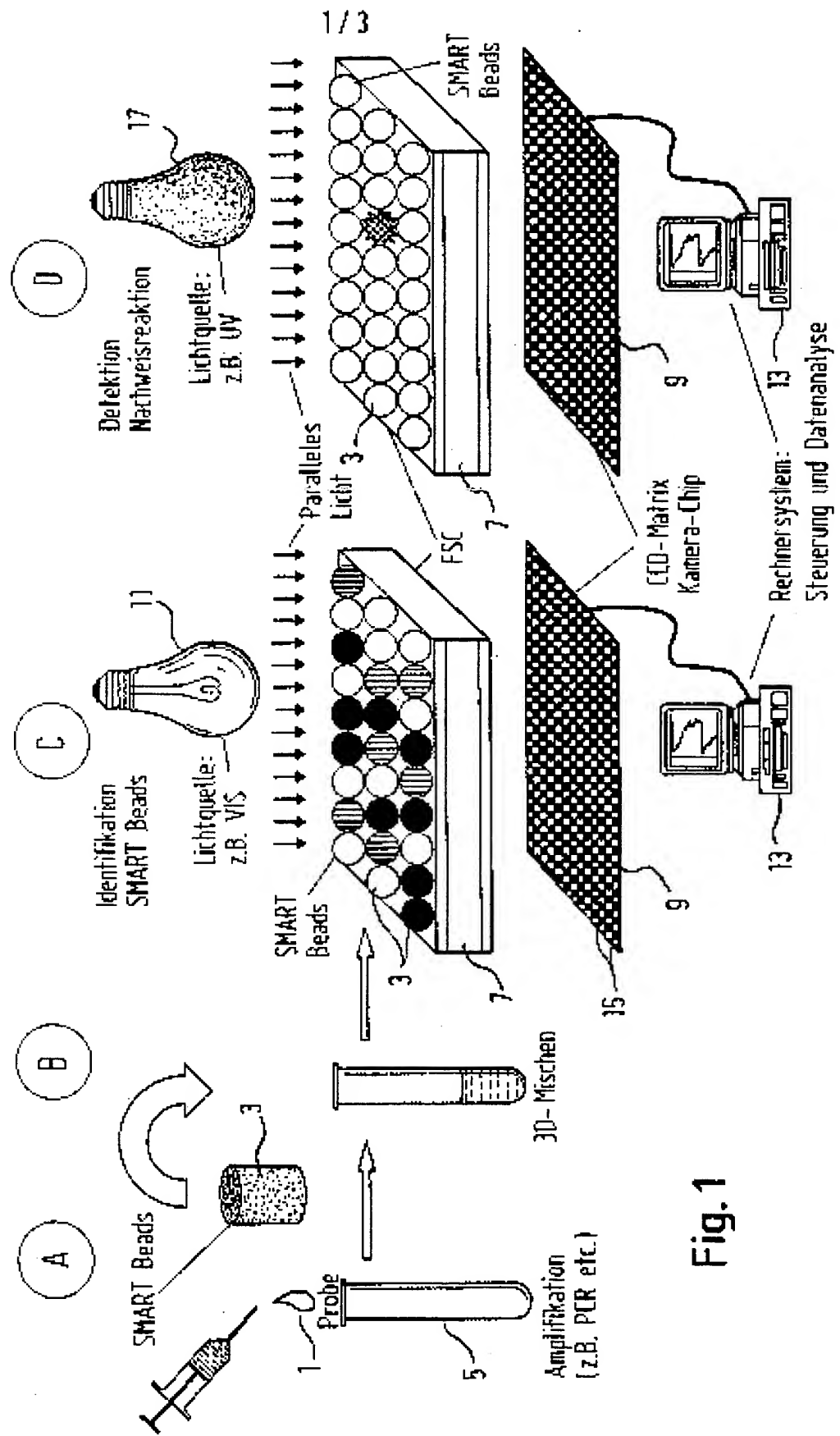
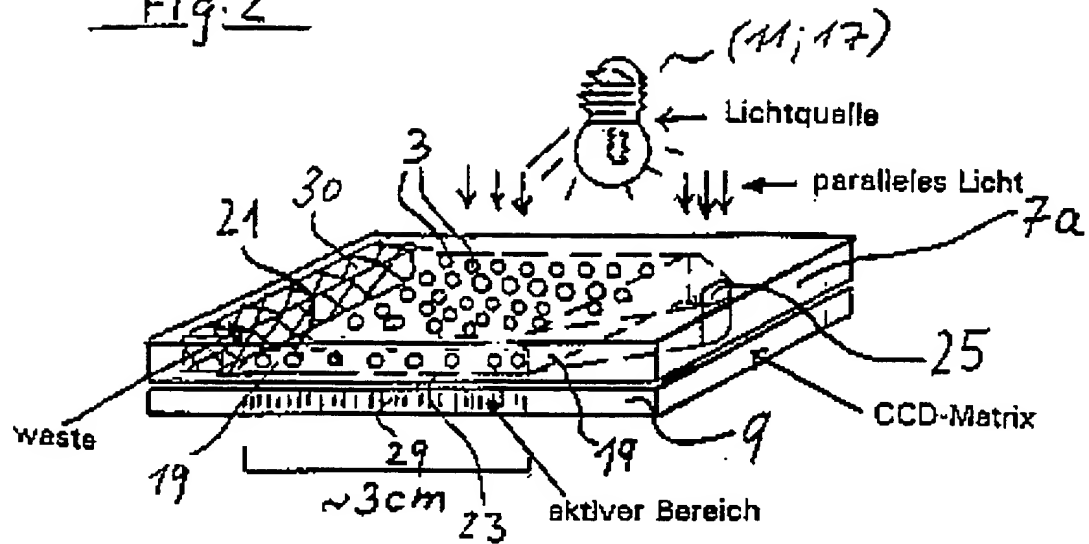
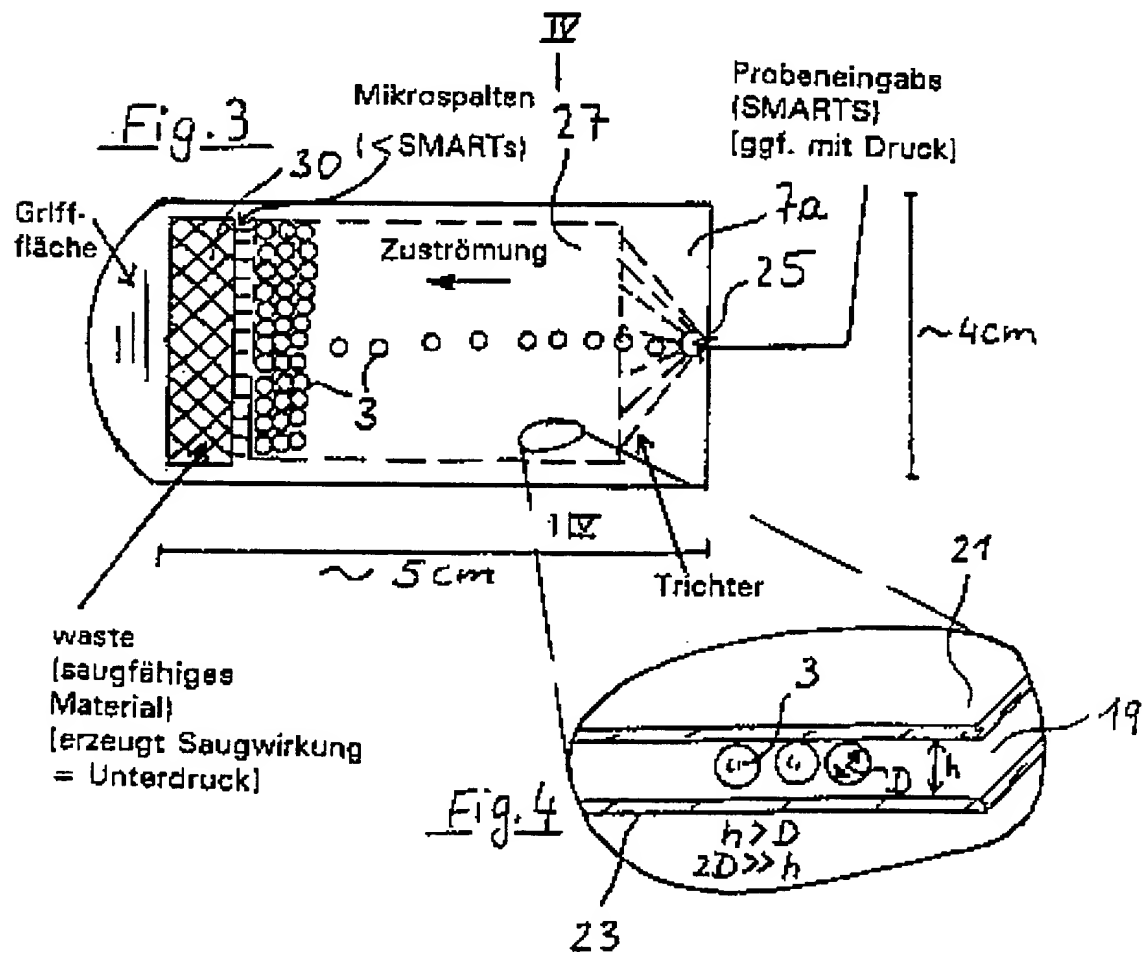
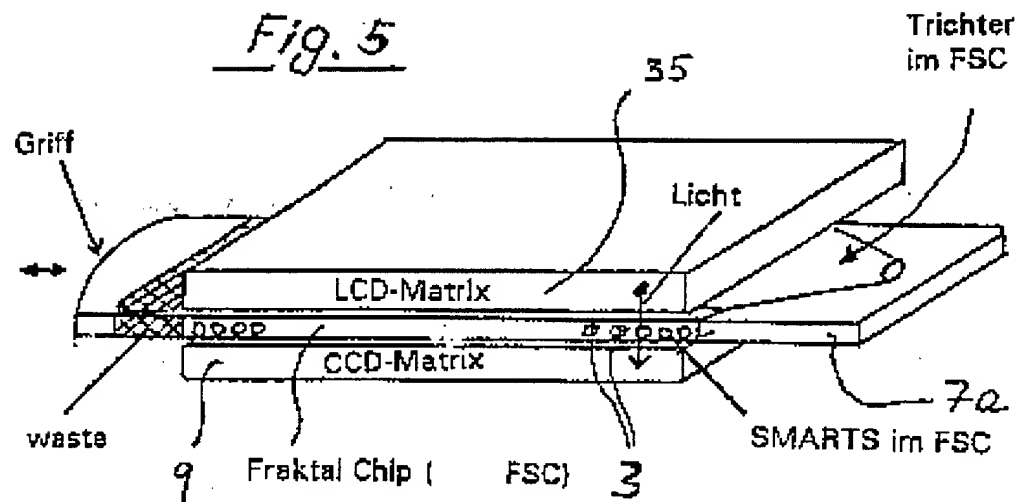


Fig.1

Fig. 2

Detektion im Durchlichtverfahren (direkte Detektion)





THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. März 2000 (09.03.2000)

PCT

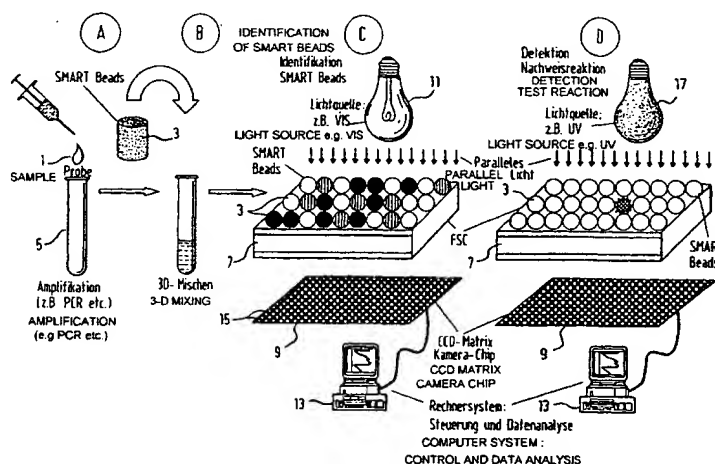
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/12123 A3

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ :	G01N 33/543	198 39 256.7	28. August 1998 (28.08.1998)	DE
		199 07 080.6	19. Februar 1999 (19.02.1999)	DE
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP99/06315	199 24 327.1	27. Mai 1999 (27.05.1999)	DE
(22) Internationales Anmeldedatum:	27. August 1999 (27.08.1999)			
(25) Einreichungssprache:	Deutsch			
(26) Veröffentlichungssprache:	Deutsch			
(30) Angaben zur Priorität:				
	198 39 254.0	28. August 1998 (28.08.1998)	DE	
	198 39 255.9	28. August 1998 (28.08.1998)	DE	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US):	FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Gässelweg 15, D-69469 Weinheim (DE).			
(72) Erfinder; und				
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):	STÄHLER, Cord, F. [DE/DE]; Siegfriedstrasse 9, D-69469 Weinheim (DE). STÄHLER, Peer, F. [DE/DE]; Riedfeldstrasse 3, D-68169 Mannheim (DE). MÜLLER, Manfred [DE/DE]; Reuterstrasse 76/b, D-80689 München (DE). STÄHLER,			

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND MEASURING DEVICE FOR DETERMINING A PLURALITY OF ANALYTES IN A SAMPLE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND MESSEINRICHTUNG ZUR BESTIMMUNG EINER VIELZAHL VON ANALYTEN IN EINER PROBE



(57) Abstract: The invention relates to a method for determining a plurality of analytes in a sample which comprises the following steps: (a) bringing the sample into contact with; (i) a plurality of species of microparticles, whereby each species is suited for detecting certain analytes and a certain coding which can be optically differentiated from other species, and bringing in contact with; (ii) a plurality of soluble, analyte-specific analytical reagents which support a signal-emitting group or which can bind with a signal-emitting group; (b) subsequently depositing the microparticles on a support and at least; (c) determining the analytes by optically detecting the coding and the quantity, and determining the presence and/or the absence of the signal-emitting groups on at least one species of individual microparticles on the support. The invention also relates to a measuring device for carrying out the inventive method.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe angegeben, umfassend die Schritte: (a) Inkontaktbringen der Probe mit (i) einer Vielzahl von Spezies von Mikropartikeln, wobei jede Spezies zum Nachweis von bestimmten Analyten geeignet ist und eine bestimmte, von anderen

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



Fritz [DE/DE]; Gässelweg 15, D-69469 Weinheim (DE).
LINDNER, Hans [DE/DE]; Vierreichenweg 27, D-70569
Stuttgart (DE).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9,
D-81679 München (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:

12. April 2001

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

Spezies optisch unterscheidbare Codierung aufweist, und (ii) einer Vielzahl von löslichen analytspezifischen Nachweisreagenzien, die eine signalgebende Gruppe tragen oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig sind; (b) anschließendes Aufbringen der Mikropartikel auf einen Träger und mindestens (c) Bestimmen der Analyten durch optisches Erfassen der Codierung und der Menge, des Vorhandenseins oder/und der Abwesenheit der signalgebenden Gruppen auf mindestens einer Spezies von individuellen Mikropartikeln auf dem Träger. Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Meßeinrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q B01L B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, INSPEC, COMPENDEX, IBM-TDB

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 126 450 A (TRIPATZIS IOANNIS) 28 November 1984 (1984-11-28) abstract	1-24, 27-29 25,26, 39-42
Y	page 6, line 18,19 page 7, line 8-26 page 8, line 1-11 claims 13-28 ---	
Y	EP 0 713 089 A (BIO SENSOR KENKYUSHO KK) 22 May 1996 (1996-05-22) abstract column 4, line 20-32 ---	25,26
Y	EP 0 422 708 A (ARES SERONO RES & DEV LTD) 17 April 1991 (1991-04-17) claim 1 figure 1 ---	39-42
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 2000

Date of mailing of the international search report

11.12.2000

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thomas, R.M.

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 296 136 A (WALLAC OY) 21 December 1988 (1988-12-21) abstract column 3, line 43-45, 53-58 claim 1 ---	1-29, 39-42
A	WO 96 22531 A (SOINI ERKKI ; HAENNINEN PEKKA (FI); SOINI JUHANI (FI)) 25 July 1996 (1996-07-25) abstract claim 1 ---	1-29, 39-42
A	US 5 162 863 A (ITO YUJI) 10 November 1992 (1992-11-10) claims ---	1-29, 39-42
Y	EP 0 723 146 A (SRI) 24 July 1996 (1996-07-24) page 9, line 6 - line 7 page 14, line 15 - line 37 page 22, line 39 - page 23, line 5 page 24, line 14 - line 17 page 31, line 9 - line 16 figures 7A, 10, 24 ---	30, 31, 34, 36, 38
A	figures 7A, 10, 24 ---	32, 33
Y	D.R. WALT: "Fiber-optic imaging sensors" ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH., vol. 31, no. 5, 19 May 1998 (1998-05-19), pages 267-278, XP002140931 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. WASHINGTON., US ISSN: 0001-4842 page 275, right-hand column, last paragraph - page 277, right-hand column, line 33; figure 17 ---	30, 31, 34, 36, 38
X	WO 97 35189 A (UNIVERSITY OF WASHINGTON) 25 September 1997 (1997-09-25) page 9, paragraph 1 - paragraph 2 page 10, line 4 - line 27 figures 4, 5 ---	42
Y	figures 4, 5 ---	39, 40
Y	WO 96 28538 A (MESO SCALE TECHNOLOGIES) 19 September 1996 (1996-09-19) page 73, line 6 - line 12 page 76, line 22 - line 35 page 132, line 10 - line 13 figures 8, 42 ---	39, 40
A	GB 2 318 636 A (CAMBRIDGE IMAGING) 29 April 1998 (1998-04-29) page 17, line 10 - line 13 figure 7 ---	30

-/--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	S. SAVOY et al.: "Solution-based analysis of multiple analytes by a sensor array: towards the development of an 'electronic tongue'". Conference on Chemical Microsensors and Applications, Boston Massachusetts, US, 4-5 November 1998, PROCEEDINGS SPIE, Bd. 3539, Seiten 17-26. XP000964999 abstract page 20, last paragraph -page 21, line 4 page 23, line 3 - line 5 page 24, line 1 -page 25, last line figures 2,8-10 ---	30,31, 33,34, 36,37
P,X	J.J. LAVIGNE et al.: "Single analyte to multi-analyte fluorescence sensors". Conference on Advances in Fluorescence Sensing Technologies IV, San Jose, California, US, 24-27 Januar 1999. PROCEEDINGS SPIE, Bd. 3602, Seiten 220-231 XP000964998 page 226, paragraph 2 -page 227, last line; figures 6B-8 ---	30,31, 33,34, 36,37
E	WO 00 04372 A (UNIVERSITY OF TEXAS) 27 January 2000 (2000-01-27) page 7, line 31 -page 8, line 4 page 8, line 20 - line 30 page 23, line 17 - line 20 page 26, line 9 - line 14 figure 1 ---	30,31, 33,34, 36,37
P,X	WO 98 53300 A (LYNX THERAPEUTICS) 26 November 1998 (1998-11-26) page 5, line 18 -page 6, line 5 page 6, line 18 - line 24 page 7, line 20 - line 23 figures 1-3 -----	39-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 00/06315**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1-29, 39-42 (in part)

Method for determining a plurality of analytes in a sample comprising the following steps:

- 1) Bringing the sample into contact; (a) with a plurality of species of microparticles, whereby each species is suited for detecting certain analytes and has a certain coding which can be optically differentiated from other species, and; (b) with a plurality of soluble analyte-specific analytical reagents which support a signal-emitting group or which can bind with a signal-emitting group;
- 2) depositing the microparticles onto a support, and;
- 3) determining the analytes by optically detecting the coding and the quantity, and determining the presence and/or the absence of the signal-emitting groups on at least one species of individual microparticles located on the support.

2. Claims Nos. 30-38, 39-42 (in part)

Measuring device for determining a plurality of analytes in a sample comprising:

- a) an electronic image recording sensor for carrying out an essentially non-enlarged image-like detection of the optical behavior of an ensemble of microparticles which are brought into contact with the sample and are deposited onto a support;
- b) means for exciting the signal emission of signal-emitting groups on microparticles in the ensemble of microparticles located on the support;
- c) a data processing device which evaluates image data of the electronic image recording sensor and which provides information concerning the presence of certain analytes in the sample based on the detected optical behavior of the ensemble of microparticles.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/06315

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0126450	A	28-11-1984	DE 3322373 A	22-11-1984
			AT 80469 T	15-09-1992
			CA 1248873 A	17-01-1989
			DE 3485912 A	15-10-1992
			JP 2040626 C	28-03-1996
			JP 7054324 B	07-06-1995
			JP 60035265 A	23-02-1985
			DK 305084 A	23-12-1984
			NO 842501 A	27-12-1984
EP 0713089	A	22-05-1996	JP 8136546 A	31-05-1996
			US 5981202 A	09-11-1999
EP 0422708	A	17-04-1991	AT 62752 T	15-05-1991
			AT 52856 T	15-06-1990
			AT 41526 T	15-04-1989
			AT 143289 T	15-10-1996
			AU 2967289 A	25-05-1989
			AU 583040 B	20-04-1989
			AU 4491085 A	10-01-1986
			AU 588245 B	14-09-1989
			AU 4491185 A	10-01-1986
			AU 581669 B	02-03-1989
			AU 4491385 A	10-01-1986
			CA 1231136 A	05-01-1988
			CA 1246891 A	20-12-1988
			CA 1261256 A	26-09-1989
			DE 3568874 D	20-04-1989
			DE 3577748 D	21-06-1990
			DE 3582532 D	23-05-1991
			DE 3588124 D	31-10-1996
			DE 3588124 T	20-02-1997
			EP 0171148 A	12-02-1986
			EP 0170375 A	05-02-1986
			EP 0170376 A	05-02-1986
			WO 8600135 A	03-01-1986
			WO 8600141 A	03-01-1986
			WO 8600138 A	03-01-1986
			JP 3010902 B	14-02-1991
			JP 61502418 T	23-10-1986
			JP 2527933 B	28-08-1996
			JP 61502419 T	23-10-1986
			JP 2024459 B	29-05-1990
			JP 61502420 T	23-10-1986
			US 4978503 A	18-12-1990
			US 4810658 A	07-03-1989
EP 0296136	A	21-12-1988	SE 458968 B	22-05-1989
			DE 3870324 A	27-05-1992
			JP 1035268 A	06-02-1989
			JP 2638085 B	06-08-1997
			SE 8702511 A	17-12-1988
			US 5028545 A	02-07-1991
WO 9622531	A	25-07-1996	FI 96641 B	15-04-1996
			FI 951040 A	08-09-1996
			EP 0804732 A	05-11-1997
			JP 10512670 T	02-12-1998

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9622531	A		US 5891738 A	06-04-1999
			EP 0815447 A	07-01-1998
			WO 9627798 A	12-09-1996
			JP 11503824 T	30-03-1999
US 5162863	A	10-11-1992	JP 1207663 A	21-08-1989
			JP 1989593 C	08-11-1995
			JP 7018879 B	06-03-1995
			JP 1270643 A	27-10-1989
			JP 1996884 C	08-12-1995
			JP 7031114 B	10-04-1995
			JP 2024560 A	26-01-1990
			FR 2627286 A	18-08-1989
EP 0723146	A	24-07-1996	AT 170004 T	15-09-1998
			CA 2144527 A	31-03-1994
			DE 69320484 D	24-09-1998
			DE 69320484 T	24-12-1998
			DK 660936 T	25-05-1999
			EP 0660936 A	05-07-1995
			ES 2123063 T	01-01-1999
			JP 8501632 T	20-02-1996
			WO 9407142 A	31-03-1994
			US 5674698 A	07-10-1997
			US 5736410 A	07-04-1998
			US 5891656 A	06-04-1999
WO 9735189	A	25-09-1997	US 5747349 A	05-05-1998
			AU 4000197 A	10-10-1997
WO 9628538	A	19-09-1996	AU 720625 B	08-06-2000
			AU 5420596 A	02-10-1996
			BR 9607193 A	11-11-1997
			CA 2213854 A	19-09-1996
			CN 1186513 A	01-07-1998
			CZ 9702844 A	14-10-1998
			EP 0821726 A	04-02-1998
			HU 9801679 A	28-10-1998
			JP 11502617 T	02-03-1999
			US 6066448 A	23-05-2000
			US 6140045 A	31-10-2000
			US 6090545 A	18-07-2000
GB 2318636	A	29-04-1998	EP 0937238 A	25-08-1999
			WO 9815814 A	16-04-1998
WO 0004372	A	27-01-2000	AU 5316599 A	07-02-2000
WO 9853300	A	26-11-1998	AU 7715598 A	11-12-1998
			EP 0985142 A	15-03-2000
			US 6013445 A	11-01-2000

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C12Q B01L B01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, INSPEC, COMPENDEX, IBM-TDB

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 126 450 A (TRIPATZIS IOANNIS) 28. November 1984 (1984-11-28)	1-24, 27-29
Y	Zusammenfassung Seite 6, Zeile 18,19 Seite 7, Zeile 8-26 Seite 8, Zeile 1-11 Ansprüche 13-28 ---	25,26, 39-42
Y	EP 0 713 089 A (BIO SENSOR KENKYUSHO KK) 22. Mai 1996 (1996-05-22) Zusammenfassung Spalte 4, Zeile 20-32 ---	25,26
Y	EP 0 422 708 A (ARES SERONO RES & DEV LTD) 17. April 1991 (1991-04-17) Anspruch 1 Abbildung 1 ---	39-42
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11. 12. 2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Thomas, R.M.

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 296 136 A (WALLAC OY) 21. Dezember 1988 (1988-12-21) Zusammenfassung Spalte 3, Zeile 43-45, 53-58 Anspruch 1 ---	1-29, 39-42
A	WO 96 22531 A (SOINI ERKKI ; HAENNINEN PEKKA (FI); SOINI JUHANI (FI)) 25. Juli 1996 (1996-07-25) Zusammenfassung Anspruch 1 ---	1-29, 39-42
A	US 5 162 863 A (ITO YUJI) 10. November 1992 (1992-11-10) Ansprüche ---	1-29, 39-42
Y	EP 0 723 146 A (SRI) 24. Juli 1996 (1996-07-24) Seite 9, Zeile 6 - Zeile 7 Seite 14, Zeile 15 - Zeile 37 Seite 22, Zeile 39 - Seite 23, Zeile 5 Seite 24, Zeile 14 - Zeile 17 Seite 31, Zeile 9 - Zeile 16 Abbildungen 7A, 10, 24 ---	30, 31, 34, 36, 38
A	Abbildungen 7A, 10, 24 ---	32, 33
Y	D.R. WALT: "Fiber-optic imaging sensors" ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH., Bd. 31, Nr. 5, 19. Mai 1998 (1998-05-19), Seiten 267-278, XP002140931 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. WASHINGTON., US ISSN: 0001-4842 Seite 275, rechte Spalte, letzter Absatz -Seite 277, rechte Spalte, Zeile 33; Abbildung 17 ---	30, 31, 34, 36, 38
X	WO 97 35189 A (UNIVERSITY OF WASHINGTON) 25. September 1997 (1997-09-25) Seite 9, Absatz 1 - Absatz 2 Seite 10, Zeile 4 - Zeile 27 Abbildungen 4, 5 ---	42
Y	Abbildungen 4, 5 ---	39, 40
Y	WO 96 28538 A (MESO SCALE TECHNOLOGIES) 19. September 1996 (1996-09-19) Seite 73, Zeile 6 - Zeile 12 Seite 76, Zeile 22 - Zeile 35 Seite 132, Zeile 10 - Zeile 13 Abbildungen 8, 42 ---	39, 40
A	GB 2 318 636 A (CAMBRIDGE IMAGING) 29. April 1998 (1998-04-29) Seite 17, Zeile 10 - Zeile 13 Abbildung 7 ---	30
-/--		

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>S. SAVOY et al.: "Solution-based analysis of multiple analytes by a sensor array: towards the development of an 'electronic tongue'". Conference on Chemical Microsensors and Applications, Boston Massachusetts, US, 4-5 November 1998, PROCEEDINGS SPIE, Bd. 3539, Seiten 17-26. XP000964999</p> <p>Zusammenfassung Seite 20, letzter Absatz -Seite 21, Zeile 4 Seite 23, Zeile 3 - Zeile 5 Seite 24, Zeile 1 -Seite 25, letzte Zeile Abbildungen 2,8-10</p> <p>---</p>	30,31, 33,34, 36,37
P,X	<p>J.J. LAVIGNE et al.: "Single analyte to multi-analyte fluorescence sensors". Conference on Advances in Fluorescence Sensing Technologies IV, San Jose, California, US, 24-27 Januar 1999. PROCEEDINGS SPIE, Bd. 3602, Seiten 220-231 XP000964998</p> <p>Seite 226, Absatz 2 -Seite 227, letzte Zeile; Abbildungen 6B-8</p> <p>---</p>	30,31, 33,34, 36,37
E	<p>WO 00 04372 A (UNIVERSITY OF TEXAS) 27. Januar 2000 (2000-01-27)</p> <p>Seite 7, Zeile 31 -Seite 8, Zeile 4 Seite 8, Zeile 20 - Zeile 30 Seite 23, Zeile 17 - Zeile 20 Seite 26, Zeile 9 - Zeile 14 Abbildung 1</p> <p>---</p>	30,31, 33,34, 36,37
P,X	<p>WO 98 53300 A (LYNX THERAPEUTICS) 26. November 1998 (1998-11-26) Seite 5, Zeile 18 -Seite 6, Zeile 5 Seite 6, Zeile 18 - Zeile 24 Seite 7, Zeile 20 - Zeile 23 Abbildungen 1-3</p> <p>-----</p>	39-42

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-29, 39-42 (teilweise)

Verfahren zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe umfassend die Schritte:

- 1) Inkontaktbringen die Probe mit (a) einer Vielzahl von Spezies von Mikropartikeln, wobei jede Spezies zum Nachweis von bestimmten analyten geeignet ist und eine bestimmte, von anderen Spezies optisch unterscheidbare Codierung aufweist, und (b) einer Vielzahl von löslichen analytspezifischen Nachweisreagenzien, die eine signalgebende Gruppe tragen oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig sind;
- 2) Aufbringen der Mikropartikel auf einen Träger;
- 3) Bestimmen der Analyten durch optisches Erfassen der Codierung und der Menge, des Vorhandenseins oder/und der Abwesenheit der signalgebenden Gruppen auf mindestens einer Spezies von individuellen Mikropartikeln auf dem Träger.

2. Ansprüche: 30-38, 39-42 (teilweise)

Messeinrichtung zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe umfassend:

- a) einen elektronischen Bilderfassungssensor zur im wesentlichen unvergrössert-bildweisen Detektion des optischen Verhaltens eines Ensembles von mit der Probe in Kontakt gebrachten, auf einen Träger aufgebrachten Mikropartikeln;
- b) Mittel zur Anregung der Signalabgabe signalgebender Gruppen an Mikropartikeln in dem Ensemble von Mikropartikeln auf dem Träger;
- c) eine Bilddaten des elektronischen Bilderfassungssensors auswertende Datenverarbeitungseinrichtung zur Bereitstellung von Informationen über das Vorhandensein bestimmter Analyten in der Probe auf der Basis des detektierten optischen Verhaltens des Ensembles von Mikropartikeln.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0126450 A	28-11-1984	DE 3322373 A	22-11-1984
		AT 80469 T	15-09-1992
		CA 1248873 A	17-01-1989
		DE 3485912 A	15-10-1992
		JP 2040626 C	28-03-1996
		JP 7054324 B	07-06-1995
		JP 60035265 A	23-02-1985
		DK 305084 A	23-12-1984
		NO 842501 A	27-12-1984
EP 0713089 A	22-05-1996	JP 8136546 A	31-05-1996
		US 5981202 A	09-11-1999
EP 0422708 A	17-04-1991	AT 62752 T	15-05-1991
		AT 52856 T	15-06-1990
		AT 41526 T	15-04-1989
		AT 143289 T	15-10-1996
		AU 2967289 A	25-05-1989
		AU 583040 B	20-04-1989
		AU 4491085 A	10-01-1986
		AU 588245 B	14-09-1989
		AU 4491185 A	10-01-1986
		AU 581669 B	02-03-1989
		AU 4491385 A	10-01-1986
		CA 1231136 A	05-01-1988
		CA 1246891 A	20-12-1988
		CA 1261256 A	26-09-1989
		DE 3568874 D	20-04-1989
		DE 3577748 D	21-06-1990
		DE 3582532 D	23-05-1991
		DE 3588124 D	31-10-1996
		DE 3588124 T	20-02-1997
		EP 0171148 A	12-02-1986
		EP 0170375 A	05-02-1986
		EP 0170376 A	05-02-1986
		WO 8600135 A	03-01-1986
		WO 8600141 A	03-01-1986
		WO 8600138 A	03-01-1986
		JP 3010902 B	14-02-1991
		JP 61502418 T	23-10-1986
		JP 2527933 B	28-08-1996
		JP 61502419 T	23-10-1986
		JP 2024459 B	29-05-1990
		JP 61502420 T	23-10-1986
		US 4978503 A	18-12-1990
		US 4810658 A	07-03-1989
EP 0296136 A	21-12-1988	SE 458968 B	22-05-1989
		DE 3870324 A	27-05-1992
		JP 1035268 A	06-02-1989
		JP 2638085 B	06-08-1997
		SE 8702511 A	17-12-1988
WO 9622531 A	25-07-1996	US 5028545 A	02-07-1991
		FI 96641 B	15-04-1996
		FI 951040 A	08-09-1996
		EP 0804732 A	05-11-1997
		JP 10512670 T	02-12-1998

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9622531 A		US 5891738 A	06-04-1999
		EP 0815447 A	07-01-1998
		WO 9627798 A	12-09-1996
		JP 11503824 T	30-03-1999
US 5162863 A	10-11-1992	JP 1207663 A	21-08-1989
		JP 1989593 C	08-11-1995
		JP 7018879 B	06-03-1995
		JP 1270643 A	27-10-1989
		JP 1996884 C	08-12-1995
		JP 7031114 B	10-04-1995
		JP 2024560 A	26-01-1990
		FR 2627286 A	18-08-1989
EP 0723146 A	24-07-1996	AT 170004 T	15-09-1998
		CA 2144527 A	31-03-1994
		DE 69320484 D	24-09-1998
		DE 69320484 T	24-12-1998
		DK 660936 T	25-05-1999
		EP 0660936 A	05-07-1995
		ES 2123063 T	01-01-1999
		JP 8501632 T	20-02-1996
		WO 9407142 A	31-03-1994
		US 5674698 A	07-10-1997
		US 5736410 A	07-04-1998
		US 5891656 A	06-04-1999
WO 9735189 A	25-09-1997	US 5747349 A	05-05-1998
		AU 4000197 A	10-10-1997
WO 9628538 A	19-09-1996	AU 720625 B	08-06-2000
		AU 5420596 A	02-10-1996
		BR 9607193 A	11-11-1997
		CA 2213854 A	19-09-1996
		CN 1186513 A	01-07-1998
		CZ 9702844 A	14-10-1998
		EP 0821726 A	04-02-1998
		HU 9801679 A	28-10-1998
		JP 11502617 T	02-03-1999
		US 6066448 A	23-05-2000
		US 6140045 A	31-10-2000
		US 6090545 A	18-07-2000
GB 2318636 A	29-04-1998	EP 0937238 A	25-08-1999
		WO 9815814 A	16-04-1998
WO 0004372 A	27-01-2000	AU 5316599 A	07-02-2000
WO 9853300 A	26-11-1998	AU 7715598 A	11-12-1998
		EP 0985142 A	15-03-2000
		US 6013445 A	11-01-2000